Isolierung und Nachweis verschiedener Zwischenprodukte d. Tryptophan-Biosynthese bei Mikroorganismen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt

von

Manfred K. Hildinger

aus Karlsruhe

- 1959 -

6205

Tag der mündlichen Prüfung: . . . . 19. Februar 1959

Dekan: . . . . . Professor Dr. H. Siedentopf

1. Berichterstatter: . . . . Professor Dr. H. Hellmann

2. Berichterstatter: . . . . Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Isolierung und Nachweis verschiedener Zwischenprodukte d. Tryptophan-Biosynthese bei Mikroorganismen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt

von

Manfred K. Hildinger

aus Karlsruhe

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN 1959

Druck: O. Berenz, Karlsruhe, Waldstr. 8

Herrn Professor Dr.Heinrich H e l l m a n n,
unter dessen Leitung die vorliegende
Arbeit entstand, möchte ich meinen
herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Dr.Franz L i n g e n s
danke ich für viele wertvolle
Anregungen und Diskussionen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549606_0055

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. E I N L E I T U N G 9

1. Rückblick auf die Entwicklung der biochemischen Genetik der Mikroorganismen 9

2. Erforschung der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren bei Mikroorganismen, insbesondere des Tryptophans 13

II. T H E O R E T I S C H E R T E I L 26

1. Problemstellung der eigenen Arbeit 26

2. Induzierung von Mangelmutanten von Escherichia coli durch UV-Strahlung und Isolierung durch Penicillin-Selektion .. 26

3. Isolierung und Nachweis von N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamin bei Salmonella-Mutanten 27

4. Isolierung und Nachweis von 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyfructose bei Saccharomyces-Mutanten 32

5. Isolierung und Nachweis von N-(o-Carboxyphenyl)-sedoheptulosylamin bei Saccharomyces-Mutanten 33

6. Isolierung eines in seiner Struktur nicht aufgeklärten Zwischenproduktes der Tryptophan-Biosynthese bei Salmonella typhimurium 35

Seite

III. EXPERIMENTELLER TEIL 43

1. Mikrobiologische Versuche 43

2. Isolierung von N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamin 51

3. Isolierung von 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyfructose 55

4. Isolierung von N-(o-Carboxyphenyl)-sedoheptulosylamin 58

5. Isolierung des Akkumulates von Salmonella typhimurium try-8 60

ZUSAMMENFASSUNG 67

LITERATURVERZEICHNIS 69

I. EINLEITUNG

1. Rückblick auf die Entwicklung der biochemischen Genetik der Mikroorganismen

Mit dem Erscheinen der Arbeit von Georg W. Beadle und Edward L. Tatum "Genetic control of biochemical reactions in Neurospora" im Jahre 1941 (1) entwickelte sich ein neuer Zweig der biologischen Forschung: die biochemische Genetik. Die in dieser Arbeit entwickelte Theorie über die Natur und die Wirkungsweise der Gene, später kurz als "Ein Gen - Ein Enzym - Theorie" bekanntgeworden, wirkte außerordentlich befruchtend auf die moderne experimentelle Biologie und Biochemie.

Die biochemische Genetik ist ein gutes Beispiel für die Zusammenarbeit zweier naturwissenschaftlicher Disziplinen, denn hier müssen die biologischen Methoden der Genetik die der Biochemie ergänzen. Dodge (2) und vor allem Lindegren (3) hatten bereits auf die Brauchbarkeit des Ascomyceten Neurospora für die genetische Analyse hingewiesen, aber erst die Forschergruppe an der Stanford-Universität in Kalifornien verwandelte die theoretischen Überlegungen in eine fruchtbringende Praxis.

Die Untersuchungen über biochemische Mutationen bei Mikroorganismen benutzten die Hypothese, daß jedes Gen die Bildung eines bestimmten Enzyms bewirkt, welches seinerseits eine chemische Reaktion steuert, und daß das mutierte Allel die Fähigkeit zur Enzymbildung verloren hat. Die "Ein Gen-Ein Enzym-Theorie" hat, gemessen an den damals einsetzenden experimentellen Arbeiten, gute Dienste geleistet, obwohl sie durch die Resultate nicht

völlig bestätigt aber auch nicht widerlegt wurde.

Zwischen dem Gen - heute chemisch als Desoxyribonucleoproteid aufgefaßt - und "seinem" Enzym besteht ein spezifischer struktureller Zusammenhang. Die Struktur des Gens ist in der Struktur des korrespondierenden Ferments repräsentiert. Das Gen ist Träger einer Information, welche die Sequenz und räumliche Anordnung der Aminosäuren in der Enzymmolekel bestimmt. Es hat den Anschein, als ob die Synthese spezifischer Proteinmoleküle letztlich in jedem Falle eines Modells oder eines Satzes von Instruktionen (=Information) bedarf. Die genetische Information ist artspezifisch, konstant und wird von Generation zu Generation übertragen. Dies gilt sowohl für Mikroorganismen als auch für höhere Lebewesen. Die einzigen biologischen Einheiten, die diese Bedingungen erfüllen, sind die Gene. Wenn das Bild korrekt ist, muß es möglich sein, durch Genmutation nicht nur einen Verlust oder eine Verminderung der enzymbildenden Aktivität zu erreichen, sondern auch qualitative Veränderungen in der Struktur des Enzyms. Es ist wahrscheinlich geworden, daß ein Genlocus eine physiologisch unteilbare Einheit darstellt. Beschädigung oder Veränderung irgendeines Teiles dieses spezifischen Chromosomenbezirkes resultiert in der Bildung defekter Enzymmoleküle oder vielleicht auch im völligen Ausfall der Enzymbildung. Die Frage nach dem Reaktionsmechanismus der gengesteuerten Enzymbildung ist noch Gegenstand der Diskussion. In einigen Fällen ist eine Beziehung zwischen Gen und Ferment klargestellt in dem Sinne, daß das Enzym in der biochemischen Mangelmutante fehlt oder daß fehlerhafte Proteinmoleküle vorkommen (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

Das Gen ist in erster Linie durch seine Wirkung charakterisiert, durch Ausprägung eines bestimmten erblichen Merkmals oder Phäns. Die Mutation ist eine Veränderung des Gens, die Tatsache der Veränderung im Genotyp wird oft erst durch Entwicklung eines vom Normalen abweichenden Phänotyps sichtbar. Zum Phänotyp eines Organismus rechnen u.a. seine Stoffwechselfunktionen.

Die Arbeit mit genetisch blockierten Mikroorganismen wurde durch die Isolierung und Charakterisierung einer großen Anzahl von Mutanten mit Stoffwechseldefekten von Neurospora crassa eingeleitet. Zur Erzeugung von Mutanten wurden Konidien Röntgenstrahlen ausgesetzt (13). Die behandelten Sporen läßt man auskeimen, kreuzt sie mit einem Wildstamm entgegengesetzten Typs und isoliert die einzelnen Ascosporen, aus denen man neue Kulturen aufzieht. Jede Ascospore wird auf einem kompletten Nährboden, wenn es sich um die Isolierung von Stoffwechsel-Mangelmutanten handelt, kultiviert. Dann wird der Stamm isoliert und sein spezieller Wuchsstoffbedarf ermittelt.

Beadle und Tatum waren erst bei ihrem 299. Versuch zur Auslösung von Mutationen bei Neurospora durch Einwirkung von Röntgenstrahlen erfolgreich. Sie testeten im Verlauf ihrer Untersuchungen bis 1947 über 80 000 einzelne Ascosporen aus und besaßen im Augenblick der Veröffentlichung der ersten Resultate bereits eine größere Sammlung defekter Stämme (13, 14, 15). Bald erschienen weitere Veröffentlichungen verschiedener Arbeitsgruppen über Untersuchungen an Neurospora, welche die Anschauungen von Beadle und Tatum stützten (16, 17, 18, 19). Aus den Anfangserfolgen resultierten in den folgenden Jahren neue Techniken und verbes-

serte Verfahren für die Anwendung von Mikroorganismen als Objekte der biochemischen Genetik (20, 21, 22, 23).

In prinzipiell gleicher Weise wurden bei verschiedenen Bakterien und anderen Mikroorganismen biochemische Mutanten erzeugt und untersucht (24, 25). Bakterienzellen oder Konidien werden mit Röntgenstrahlen oder Ultraviolettlicht bestrahlt oder mutagenen Chemikalien (26) wie Senfgas (Dichlordiäthylsulfid), Stickstoff-Lost (N-Methyl-di-(ß-chloräthyl)-amin), Diazomethan, Epoxyden, Äthylen-iminen u.a. ausgesetzt. Auch durch Hitzeeinwirkung lassen sich bei Bakterien Mutationen hervorrufen (27). Zur Isolierung der erzeugten Mutanten sind verschiedene Verfahren ausgearbeitet worden (28, 29). 1948 veröffentlichten B.D. Davis und gleichzeitig Lederberg und Zinder (20, 21, 22) die "Penicillin screening method". Die Wirkung des Penicillins erlaubt die Selektion der induzierten Mutanten von den Zellen der Ausgangspopulation auf relativ einfache Weise, da Penicillin nur Bakterienzellen in der Wachstumsphase abtötet, und da in einem Minimalmedium nur die Wildform wachsen kann.

Es erwies sich als möglich, bei Mikroorganismen zahlreiche Mutationen durch die Einwirkung sowohl physikalischer als auch chemischer Mutagene auszulösen, die sich innerhalb derselben Biosynthesekette durch Ausfall verschiedener Enzyme manifestieren. So ist die heutige Kenntnis über die biochemische Entstehung der Aminosäuren, Purine, Pyrimidine und Vitamine fast ausschließlich durch Untersuchungen an Mangelstämmen verschiedener Mikroorganismen gewonnen worden.

B.D. Davis machte die Beobachtung, daß in vielen Fällen durch Zufuhr bestimmter Stoffe der physiologische Mangelzustand bei den Defektmutanten überwunden werden kann, daß aber gleichzeitig der abhängige Organismus Verbindungen ins Nährmedium abgibt, die in Beziehung zum Defektfaktor stehen. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluß gezogen, daß das ausgeschiedene bzw. akkumulierte Produkt das normale Substrat für die fehlenden oder mangelhaften Enzymmoleküle darstellt, und daß Substanzen, die den Bedarf einer Mangelmutante befriedigen konnten, in der Biosynthesekette der akkumulierten Verbindung nachgeordnet sein müßten.

2. Erforschung der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren bei Mikroorganismen insbesondere des Tryptophans+

Bis vor wenigen Jahren bestand wenig Klarheit über den Syntheseweg der aromatischen Verbindungen bei Pflanzen und Mikroorganismen. Ein günstiger Angriffspunkt für dieses Problem ergab sich auch hier aus der "Mutanten-Technik". Im Laboratorium von B.D. Davis gelang es, einige aromatische Polyauxotrophe von Escherichia coli zu isolieren (20, 25), d.h. Mutanten, die vier aromatische Verbindungen benötigen, um normal wachsen und sich fortpflanzen zu können. Die Verbindungen sind Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und p-Aminobenzoesäure, daneben Spuren von p-Hydroxybenzoesäure. Später wurde aus dem Institut von Tatum auch über einen polyauxotrophen Stamm von Neurospora crassa berichtet (30). Die aromatische Struktur der vier Verbindungen führte

+ Formelschema für die erwähnten Biosyntheseschritte siehe Abbildung 9, Seite 42 (ausklappbare Tafel).

zu einer intensiven Suche nach einem gemeinsamen Vorprodukt, das sie ersetzen konnte. Nach erfolglosem Austesten von etwa 55 Verbindungen aromatischen oder hydroaromatischen Charakters, wurde schließlich Shikimisäure (3, 4, 5-Trihydroxy-cyclohexen-1-carbonsäure), eine bereits bekannte Pflanzensäure von B.D. Davis als eine für einige der Polyauxotrophen aktive Substanz erkannt (31). Unabhängig davon fanden Tatum und Mitarbeiter für die Quatrupel-Mutante von Neurospora die Aktivität der Shikimisäure als Vorstufe dieser vier biologisch wichtigen Aromaten (30). Nachdem gezeigt worden war, daß andere Coli- und Aerobacter-Mutanten Shikimisäure in ihren Kulturmedien ansammeln, gelang auch die Identifizierung und Isolierung der Shikimisäure (32). Kürzlich wurde Shikimisäure auch aus dem Nährmedium einer Hefemutante isoliert (33). Als unmittelbare Vorstufe der Shikimisäure wurde die 5-Dehydroshikimisäure erkannt. Sie konnte aus der Nährlösung eines auxotrophen Stammes von Aerobacter aerogenes isoliert werden (34): Diese Verbindung war zunächst durch "Cross-feeding" entdeckt worden. Man fand, daß Mutanten mit einem genetischen Block unmittelbar vor Shikimisäure eine Vorstufe akkumulieren, die Stämmen mit noch früheren genetischen Blockierungen das Wachstum auf Minimalmedium ermöglichen. Durch weitere Untersuchungen an E.coli bzw. Aerobacter aerogenes wurde die Dehydrochinasäure entdeckt und isoliert (35). Diese Verbindung wird als Vorläufer der 5-Dehydroshikimisäure angesehen. Die nahe verwandte Chinasäure kann in hohen Konzentrationen den Bedarf einer Neurospora-Mutante decken, die nicht mit Shikimisäure wächst und die nur mit einem Gemisch von Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und p-Aminobenzoesäure zum Wachstum gebracht werden kann (36).

Bei Bakterien scheint die Rolle der Chinasäure nicht eindeutig geklärt zu sein; als Akkumulat wurde sie bisher bei Mikroorganismen nicht gefunden (37). Carr und Mitarbeiter (38) fanden, daß Zellsuspensionen von Lactobacillus pastorianus var. quinicus Chinasäure zu Dihydroshikimisäure reduzieren.

Die Reduktion der 5-Dehydroshikimisäure zu Shikimisäure wurde auch an ihrem spezifischen Enzymsystem untersucht (39). Die 5-Dehydroshikimi-Reduktase, welche Triphosphopyridinnucleotid als Wasserstoffakzeptor benötigt, fehlte in einer Mutante mit Block zwischen 5-Dehydroshikimisäure und Shikimisäure. Auch die enzymatische Umwandlung der 5-Dehydrochinasäure in 5-Dehydroshikimisäure wurde studiert. In diesem Falle wurde kein Cofaktor nachgewiesen. Auch hier besaß der Bakterien-Wildtyp das Enzym (40). Durch diese Arbeiten wurden weitere sichere Beweise dafür erbracht, daß 5-Dehydrochinasäure und 5-Dehydroshikimisäure tatsächlich als echte Zwischenprodukte der aromatischen Biosynthese vorkommen, und daß eine Veränderung im Genom eines Mikroorganismus' den Ausfall eines spezifischen, gengesteuerten Enzyms bedingt.

Jenseits der Shikimisäure konnten drei akkumulierte Verbindungen (41, 42) aufgefunden werden, von denen keine die Eigenschaft besitzt, irgendeine Mutante zum Wachstum zu bringen. Es sind 5-Phosphorshikimisäure (wahrscheinlich ein Seitenprodukt), "Compound Z 1", dessen Struktur noch nicht eindeutig geklärt ist, und Prephensäure. Vielleicht trifft die Annahme zu, daß es sich bei "Compound Z 1" um ein säurelabiles Shikimisäure-Brenztraubensäure-Konjugat handelt. Es wird weiter angenommen, daß die-

se Verbindung durch Umlagerung leicht in die dritte isolierte Substanz, Prephensäure, übergeht, die ihrerseits durch Abspaltung von Wasser und Austritt von Kohlendioxyd Phenylbrenztraubensäure bilden würde. Phenylbrenztraubensäure wird von Phenylalanin-Mangelmutanten akkumuliert. Prephensäure konnte zuerst aus dem Medium von Escherichia coli-Mutanten (43), später auch bei Neurospora-Mutanten isoliert werden (44). Die Entdeckung der Prephensäure geht allerdings auf eine frühere Beobachtung von Simmonds (45) zurück, daß eine Phenylalanin-Mangelmutante nach längerer Züchtung einen Wuchsstoff im Medium ansammelt, der den Mangelzustand beheben kann. Die Entdeckung, daß solche Mutanten Prephensäure ansammeln, die bei saurem pH der Nährlösung spontan in Phenylbrenztraubensäure übergeht, die ihrerseits enzymatisch durch die Mutante in Phenylalanin umgewandelt wird, gelang B.D. Davis (46) und unabhängig davon Katagiri (47, 48). Miller und Simmonds (49) konnten zeigen, daß der Übergang von Prephensäure zu Tyrosin und Phenylalanin irreversibel ist.

Verschiedene Arbeiten mit Glucose-1-^{14}C, Brenztraubensäure-2-^{14}C und Acetat-1-^{14}C als alleinige Kohlenstoff-Quelle haben gezeigt, daß die Bildung der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin bei Bakterien und Hefen dem allgemeinen Weg

Acetat- → Pyruvat → Glucose → Shikimat → aromatische Aminosäuren folgt (50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57). Wegen der Symmetrie des Tyrosins konnte allerdings nur die Herkunft des C_4-Atoms exakt bestimmt werden, bei den C-Atompaaren 3,5 und 2,6 konnte die Frage nach dem Ursprung der individuellen Atome nicht beantwortet werden. In anschließenden Versuchen (58) wurde Aerobacter aerogenes mit Acetat-1-^{14}C als alleinige C-Quelle

gezüchtet und Tryptophan aus einem alkalischen Bakterienhydrolysat isoliert. Abbaumethoden zeigten, daß drei aufeinanderfolgende C-Atome des Benzolringes des Tryptophans dem Acetat-Carboxyl entstammen. Ein bis zwei C-Atome des Pyrrolringes waren ebenfalls der Carboxylgruppe der Essigsäure entnommen. In der 3-C-Seitenkette des Tryptophans war das Vorkommen des Isotops auf den Carboxyl-Kohlenstoff begrenzt. Bei Hefe ist allerdings das Bild nicht klar, das sich aus der Markierung der Seitenkette bei Züchtung mit markiertem Pyruvat oder markierter Glucose als alleinige C-Quelle ergibt (59, 60). Während die Markierung in Phenylalanin oder Tyrosin der Hefe, die auf markierter Glucose oder markierter Brenztraubensäure gewachsen ist, immer identisch ist, zeigen sich Unterschiede in der Verteilung der radioaktiven C-Atome, wenn markierte Essigsäure als alleinige C-Quelle zur Verfügung gestanden hat. Gosh (61) postuliert folgende Reaktionswege:

Prephensäure ⟶ Phenylbrenztraubensäure ⟶ Phenylalanin

Prephensäure ⟶ p-Hydroxyphenylmilchsäure ⟶ Tyrosin.

Eine unmittelbare Vorstufe der 5-Dehydrochinasäure ist bisher nicht gefunden worden. Srinivasan und Mitarbeiter (62) fanden aber bei Mutanten, die vor der Dehydrochinasäure genetisch blockiert waren, ein Akkumulationsprodukt, "Compound V", das später als offenkettige Ketosäure erkannt wurde (63). Weitere Experimente mit zellfreien Extrakten erbrachten den Beweis, daß sie in kleinen Ausbeuten aus verschiedenen Hexosephosphaten erhältlich ist (64). In großer Ausbeute wurde Dehydroshikimisäure aus Sedoheptulose-1,7-disphosphat erhalten (64, 65), dabei wer-

den die Kohlenstoff-Atome 4-7 der Heptose quantitativ in die C-Atome 3-6 der Dehydroshikimisäure verwandelt. Intensivere Untersuchungen mit Hilfe von Enzymextrakten und markierten Verbindungen brachten neue Resultate, die in der Weise interpretiert werden, daß aus einer Kondensation von Phosphoenolbrenztraubensäure und D-Erythrose-4-phosphat eine neue Intermediärverbindung, die 2-Keto-3-desoxy-7-phospho-D-glucoheptonsäure, hervorgeht, die dann die 5-Dehydroshikimisäure durch Ringschluß liefert (66, 67, 68). Sedoheptulose-1,7-diphosphat ist demnach kein notwendiges Zwischenprodukt bei der Synthese der Dehydroshikimisäure, scheint aber in Enzymversuchen als Substrat dienen zu können, wobei es primär in ein C_3 - und ein C_4-Bruchstück gespalten wird. Die 2-Keto-3-desoxy-7-phospho-D-glucoheptonsäure dürfte wahrscheinlich identisch sein mit "Compound V". Siehe Abb. 1.

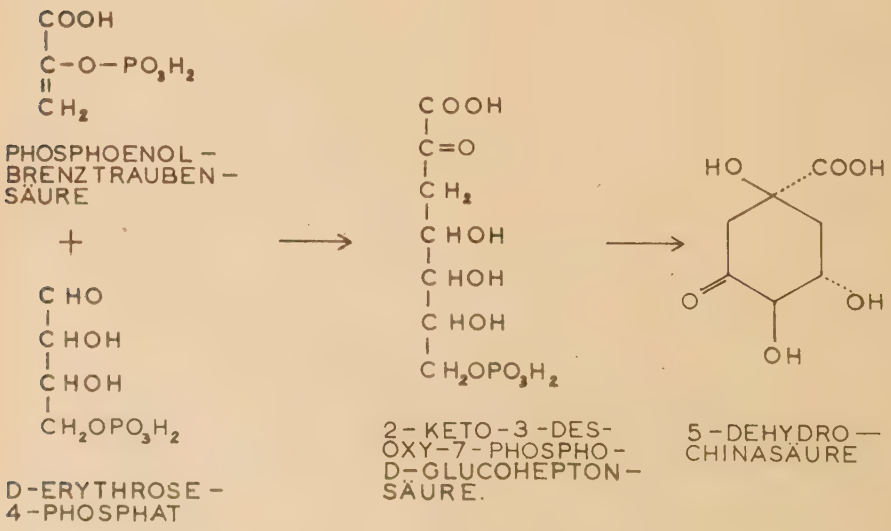


ABB. 1

In einer Arbeit aus dem Jahre 1941 beschrieb Fildes (69) zum ersten Mal Indol als Vorstufe des Tryptophans im physiologischen Geschehen bei Salmonella und Corynebacterium. Snell (70) fand, daß Anthranilsäure und Indol im Wachstumstest Tryptophan bei Lactobacillus arabinosus ersetzen können, und schloß daraus, daß auch Anthranilsäure an der Biosynthese des Tryptophans beteiligt ist. Fildes hat bereits angenommen, daß die Bildung von Tryptophan bei Bakterien über Indol verläuft.

Dieses allgemeine Schema der Tryptophan-Biosynthese wurde 1944 von Tatum, Bonner und Beadle für verschiedene Mutanten von Neurospora crassa bestätigt (71, 72). Sie nahmen auch eine direkte Kondensation von Indol und Serin zu Tryptophan an. Kurze Zeit später wurde experimentell nachgewiesen, daß die Kondensation von Indol und Serin durch ein Enzym katalysiert wird, das Pyridoxalphosphat-abhängig ist (73). Mit Hilfe einer Anthranilsäure, die am Carboxyl-C-Atom radioaktiv markiert war, konnte für Neurospora bewiesen werden, daß bei der Bildung des Tryptophans die Carboxyl-Gruppe eliminiert wird (74). Mit ^{15}N-markierter Anthranilsäure wurde dagegen die Teilnahme des Stickstoffs der Anthranilsäure bei der Ringbildung zum Indol bestätigt (75). Bei diesen Versuchen wurden Tryptophan-Mangelmutanten mit ^{15}N-markierter Anthranilsäure oder ^{15}N-markiertem Indol gezüchtet. Das markierte Stickstoff-Atom wurde in der Ringstruktur des Tryptophans wiedergefunden. Daß der Verlust der Carboxyl-Gruppe der Anthranilsäure unabhängig von der Ringschlußreaktion war, konnte Fries (76) mit dem Hymenomyceten Lentinus omphalodes zeigen, dessen Tryptophanbedarf entweder durch Anthranilsäure, Indol oder Anilin gedeckt werden konnte. Bei E. coli ist

allerdings Anilin als Wachstumfaktor nicht wirksam. (Siehe Abb. 2 Seite 21)

Mehrere Arbeiten von Yanofsky (77, 78) brachten weitere Erkenntnisse über die Reaktionen, die an der Umwandlung von Anthranilsäure zu Indol beteiligt sind. Gleichzeitig mit der Decarboxylierung erschienen die Kohlenstoffatome 1 und 2 der Ribose resp. Glucose als C-Atome 2 und 3 des Indolringes. Das Kohlenstoffatom 3 der Anthranilsäure ist am Ringschluß des Pyrrolringes nicht beteiligt. Extrakte aus E.coli wandelten im Enzymversuch Anthranilsäure in Indol um, wobei 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat das 2-C-Bruchstück lieferte. Die Bildung von Indol aus Anthranilsäure wurde ebenfalls durch Adenosintriphosphat und Ribose bzw. Ribose-5-phosphat begünstigt. Diese Ergebnisse sowie frühere Erkenntnisse anderer Autoren (79) über den Einbau von Glucose-^{14}C in das Tryptophanmolekül bei Aerobacter aerogenes ließen den Schluß zu, daß als Intermediärprodukt bei der Umwandlung der Anthranilsäure in Indol eine Anthranilsäure-Zuckerverbindung zu erwarten sei, möglicherweise vom N-Glycosid-Typ. Gots und Mitarbeiter (80) fanden zuerst eine indolähnliche Verbindung bei E.coli. Brenner (81) fand bei Salmonella typhimurium eine Verbindung, die bei alkalischer Hydrolyse leicht Indol lieferte. Trudinger (82) und Gibson (83) fanden ebenfalls bei Tryptophan-Mangelmutanten von E.coli ein akkumuliertes Produkt, das indolähnlich war, sich aber bei der Papierchromatographie und im UV-Spektrum eindeutig von Indol unterschied. Yanofsky (84, 85, 86) gelang es dann, in mehreren Arbeiten an E.coli mit zellfreien Enzymextrakten und Isolierung von Akkumulaten das Bild zu vervollständigen. Er postuliert fol-

genden Weg:

Anthranilsäure + 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat ⟶ Indolyl-3-glycerinphosphat ⟶ Indol + Triosephosphat.

Die gesuchte, von Yanofsky isolierte Zwischenstufe ist demnach Indolyl-3-glycerin bzw. dessen Phosphorsäureester. Indolyl-3-glycerin wurde unmittelbar danach (87) aus Kulturfiltraten von

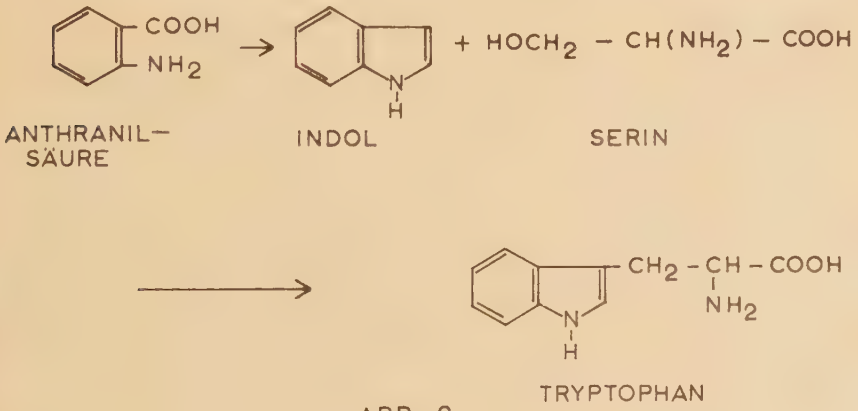
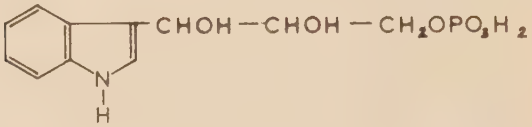


ABB. 2

Salmonella typhimurium-Mutanten und der von Gibson verwandten E.coli-Mutante 7/8 isoliert, wodurch die Arbeiten von Yanofsky erweitert und bestätigt wurden. Den stärksten Beweis für die Identität des gefundenen Stoffes erbrachten Lingens und Hellmann (88) durch die Synthese des Indolyl-3-glycerins und Vergleich der synthetischen Substanz mit dem isolierten Naturprodukt. Gots (89) gelang es auch in Fortführung seiner Arbeit Indolyl-3-glycerin aus E.coli-Mutanten rein zu isolieren. Nach einer unveröffentlichten Mitteilung soll es auch bei dem Ascomyceten Glomerella cingulata gefunden worden sein (90).

Es war überraschend, ein Indolderivat zu finden mit einer C_3-Seitenkette, die dann abgespalten wird, um durch Alanin ersetzt zu werden. Die Histidin-Biosynthese (91, 92, 93) ver-



INDOLYL-3-GLYCERIN-PHOSPHORSÄUREESTER

ABB. 3

läuft vom Imidazol-glycerinphosphat über Imidazol-acetolphosphat und Histidinol-phosphat zum Histidin. Die Glycerinseitenkette wird demnach direkt in die Alaninseitenkette des Histidins umgewandelt.

In Anlehnung an die Histidin-Synthese wäre es denkbar, einen ähnlichen Weg über analoge Zwischenprodukte auch für die Endschritte der Tryptophan-Biosynthese zu erwarten. Weder diese Möglichkeit, die Yanofsky auch in seine Betrachtung einbezogen hatte, noch Vermutungen, daß die Tryptophan-Biosynthese bei Lactobacillus arabinosus (94) über andere Zwischenprodukte verläuft, fanden allerdings durch Arbeiten an verschiedenen Bakterienstämmen (95) eine Bestätigung. Yanofsky nimmt an, daß die Tryptophan-Mangelmutanten, deren Block zwischen Anthranilsäure und Indol liegt, genetisch in zwei Gruppen zerfallen. Der einen Gruppe fehlt das Enzymsystem, das den Übergang von

Anthranilsäure zum Indolyl-3-glycerinphosphat katalysiert. Als Akkumulat findet man hier Anthranilsäure und deren Derivate. Der zweiten Gruppe fehlt das Enzym Indolyl-glycerinphosphat-Hydrolase. Als Akkumulat tritt hier im Nährmedium Indolyl-glycerin auf. Weder Indolyl-3-glycerin noch sein Phosphorsäureester können den Tryptophanbedarf entsprechender Mutanten decken. Man darf dies wohl darauf zurückführen, daß die Bakterienzellwand für Phosphorsäureester impermeabel ist, und Indolylglycerin in der Zelle nicht rephosphoryliert werden kann. Yanofsky hat vermutet, daß in der ersten Kondensationsphase ein Anthranilsäure-ribosid, nämlich N-(o-Carboxyphenyl)-ribosylamin gebildet wird, das durch Amadori-Umlagerung (109) in ein 1-Desoxy-2-keto-Zwischenprodukt übergeht. In der Enolform hätte diese Zwischenstufe die Doppelbindung des Pyrrolringes des Indols und eine Hydroxylgruppe am zweiten Kohlenstoffatom der Seitenkette, die Hydroxylgruppe wäre also in der richtigen Stellung für den Ringschluß mit dem Kohlenstoffatom des Benzolringes, an dem die Carboxylgruppe sitzt. Man kann die Möglichkeit, daß sich die Anthranilsäure-Ribose-Verbindung unter Ausschluß freier Anthranilsäure aus einem Folgeprodukt (= Stoffwechselprodukt) der Shikimisäure bildet, nicht ausschließen.

In einer neuen Kurzmitteilung glaubt Yanofsky (96) auf Grund seiner experimentellen Befunde mit Enzymextrakten aus Neurospora crassa freies Indol als Intermediärstufe bei der Biosynthese des Tryptophans, zumindest für Neurospora, ausschließen zu dürfen. Von ihm wurde folgender Reaktionsweg vorgeschlagen:

Indolyl-3-glycerinphosphat ⟶ Indol-Tryptophansynthetase (enzymgebundenes Indol) + Triosephosphat Indol-Tryptophansynthetase
L-Serin ⟶ L-Tryptophan + Tryptophansynthetase.

Umbreit (73) konnte 1946 ein zellfreies System für die Bildung von Tryptophan bei Neurospora nachweisen, er fand auch, daß Pyridoxalphosphat ein essentieller Cofaktor für diese Enzymkatalyse ist. Mitchell (97) konnte zwei Jahre später bei einer Tryptophan-Mangelmutante von Neurospora zeigen, daß der Pilzstamm keine Tryptophansynthetase (= Tryptophandesmolase) besitzt. Tryptophansynthetase wurde von Yanofsky (4) angereichert, gereinigt und in ihren Eigenschaften beschrieben. In diesen Untersuchungen wurde zum ersten Mal der Nachweis eines Zusammenhanges zwischen dem Ausfall eines spezifischen Gens und dem Fehlen einer Enzymaktivität geführt.

Der Endschritt der Tryptophan-Biosynthese, die Kondensation von Indol mit L-Serin zu Tryptophan (4, 72, 73), wurde 1954 von Tatum und Shemin (98) mit Hilfe von ^{15}N-α,ß-Deuterioserin erneut untersucht. Aus den Ansätzen von Enzymversuchen wurde dabei Tryptophan isoliert, das kein α -Deuteriumatom enthielt. Daraus wurde gefolgert, daß zwischen Indol und Serin keine intermolekulare Wasserabspaltung stattfindet, sondern daß sich aus Serin zunächst durch intramolekularen Wasseraustritt eine Verbindung vom Typ der α -Aminoacrylsäure bildet, die sich ihrerseits dann an Indol zu Tryptophan addiert. Ebenfalls 1954 fanden Snell und Mitarbeiter (99), daß als Zwischenstufe eine Schiff'sche Base aus α -Aminoacrylsäure und Pyridoxalphosphat gebildet wird.

Nachdem sich das Interesse der Forschung über die Biosynthese des Tryptophans in den vergangenen Jahren hauptsächlich auf die Endschritte der Synthesekette konzentriert hatte, brachte die Auffindung des Indolyl-3-glycerins neue Anregung. Als die eigene Arbeit begonnen wurde, gab es fast keine experimentellen Befunde über mögliche Zwischenprodukte in der Gruppe der zwischen Anthranilsäure und Indol genetisch blockierten Mangelmutanten, ebenfalls keine Anhaltspunkte über den Verlauf der Synthese zwischen Shikimisäure bzw. "Compound Z 1" und Anthranilsäure. Im Zusammenhang mit der Isolierung des Indol-3-glycerins tauchte die Vermutung auf, daß dessen Bildung über Zuckerderivate der Anthranilsäure verlaufen könnte.

II. THEORETISCHER TEIL

1. Problemstellung der eigenen Arbeit

Im Rahmen der eigenen Arbeit sollten neue Erkenntnisse über die Biosynthese des Tryptophans bei Mikroorganismen im Bereich zwischen Shikimisäure bzw. "Compound Z 1" und Indolyl-3-glycerin und ihre Gen-Abhängigkeit gewonnen werden. Es war geplant, zuerst eine größere Anzahl von Tryptophan-Auxotrophen von Escherichia coli zu isolieren und an geeigneten Mutanten die Isolierung unbekannter Zwischenprodukte zu versuchen.

2. Induzierung von Mangelmutanten von Escherichia coli durch UV-Strahlung und Isolierung durch Penicillin - Selektion

Zuerst mußten eine größere Anzahl von Bakterienmutanten durch Induktion mit UV-Licht und anschließender Selektion mit Hilfe der sog. "Penicillin-Technik" (20, 100) gewonnen werden. Tatsächlich konnte aber aus einer Serie von über 300 biochemischen Defektmutanten von Escherichia coli nur vier Tryptophan-Mangelmutanten erhalten werden, die genetisch so blockiert waren, daß Indol akkumuliert wurde. Auch in späteren größeren Serien von UV-induzierten Mutanten von Aerobacter aerogenes wurden unter 967 Mutanten nur fünf Tryptophan-Mangelmutanten isoliert, die aber alle Indolyl-3-glycerin ansammelten (101).

3. Isolierung und Nachweis von N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamin bei Salmonella - Mutanten

Aus anderen Laboratorien standen zunächst zur Verfügung: die Tryptophan-Mangelmutanten try-8, try-14 und try-16 von Salmonella typhimurium, später auch die Tryptophan-Auxotrophen H 19, AE 7 und B 6 von Saccharomyces cerevisiae (102). Keine von den Salmonella-Mutanten wuchs in dem von Kaudewitz (103) beschriebenen Minimalmedium. Try-14 und try-16 konnten erst nach Zusatz von Tryptophan oder Indol zum Wachstum gebracht werden, try-8 nach Ergänzung mit Tryptophan, Indol oder Anthranilsäure. Try-14 und try-16 hatten demnach den genetischen Block zwischen Anthranilsäure und Indol, try-8 vor Anthranilsäure. Die Hefe-Mutanten konnten erst nach Zusatz von Tryptophan oder Indol zu dem modifizierten Minimalmedium nach Wickerham (33) wachsen, sie waren auch zwischen Anthranilsäure und Indol genetisch blockiert.

Über die Biosynthese des Tryptophans bei Hefen gab es bisher kaum experimentelle Befunde (104, 105). Als die eigenen Untersuchungen schon fortgeschritten waren, erschien eine kurze Mitteilung von Parks und Douglas (106) über die Identifizierung von sogenannter "N-Fructosyl-Anthranilsäure" als mögliches Zwischenprodukt der Tryptophan-Synthese bei Saccharomyces. Die Autoren nehmen an, daß ihre Verbindung durch eine direkte Kondensation von Anthranilsäure und Fructosephosphat oder mit Glucose-6-phosphat und anschließender Amadori-Umlagerung der Glucosyl-Anthranilsäure entstanden ist. N-Fructosyl-Anthranilsäure ist aber nach der üblichen Nomenklatur eine Verbindung

vom Typ eines N-Fructosides und kein Amadori-Umlagerungsprodukt. Irgendeine der leicht durchführbaren charakteristischen Reaktionen auf Amadori-Produkte wurde nicht angestellt. Die in der Veröffentlichung beschriebene Synthese für eine Vergleichssubstanz zu der isolierten Verbindung hätte zweifellos nur zu einem N-Fructosid geführt, nicht dagegen zu einer Amadori-Verbindung. Nach längeren Vorversuchen über günstige Akkumulationsbedingungen und schonende Aufarbeitungs- und Isolierungsmethoden gelang es, aus den von Bakterienzellen befreiten Kulturmedien von Salmonella typhimurium try-14 durch Adsorption an Kohle und Papierchromatographie des konzentrierten Akkumulats eine blau fluoreszierende Verbindung zu erhalten, die sich durch R_f-Wert und Farbreaktionen auf Anthranilsäure und auf Fructose von freier Anthranilsäure eindeutig unterschied. Auf Grund der eigenen Befunde wird sie als N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamin (Fructosyl-Anthranilsäure) angesprochen (107). Die Verbindung reichert sich auch im Nährmedium an, wenn gewaschene Zellsuspensionen von Salmonella typhimurium try-14 in Minimalmedium ohne Zusatz von Tryptophan inkubiert werden. Die Prüfung auf Amadori-Produkte (108, 109) fiel negativ aus. Eine Isolierung der Verbindung in reiner Form ist bisher nicht gelungen. Sie fiel als gelbes, zersetzliches Öl an. In Versuchen, bei denen die Bakterien bei konstantem pH-Wert (6,8 - 7,2) gezüchtet wurden, gelang es durch Ausschaltung der im Verlauf des Bakterienwachstums durch ausgeschiedene Stoffwechselprodukte eintretenden Säuerung des Mediums ein intaktes Produkt zu erhalten, das sich aber beim Stehenlassen in konzentrierter Lösung doch in Anthranilsäure und Zuckeranteil spaltete. In verschiedenen Zeitabstän-

den nach der Isolierung mit Substanzproben gelaufene Chromatogramme ließen die Aufspaltung deutlich erkennen.

Zur gleichen Zeit erschien eine Kurzmitteilung von Gibson und Mitarbeitern (110) über ein mögliches Zwischenprodukt der Tryptophan-Biosynthese. Dieser Gruppe war es gelungen, bei Aerobacter-aerogenes-Tryptophanmangelmutanten eine Verbindung anzureichern, die von ihnen auf Grund ihrer Reaktionen und ihres UV-Absorptionsspektrums als 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose bezeichnet wird. Auch diesen Autoren ist keine Reindarstellung gelungen.

Nach eigenen experimentellen Befunden (107, 111, 112) in Verbindung mit den Ergebnissen von Gibson und Mitarbeitern (110, 113) sowie Parks und Douglas (106) ist anzunehmen, daß sich für die biochemische Bildungsweise des Tryptophans aus Anthranilsäure bzw. aus dem ihr unmittelbar vorausgehenden Zwischenprodukt zwei Wege möglich sind, deren einer bisher ausschließlich bei Escherichia, Salmonella, Aerobacter (sämtlich Bakterien der Familie Enterobacteriaceae), der andere dagegen nur bei Hefen aufgefunden werden konnte.

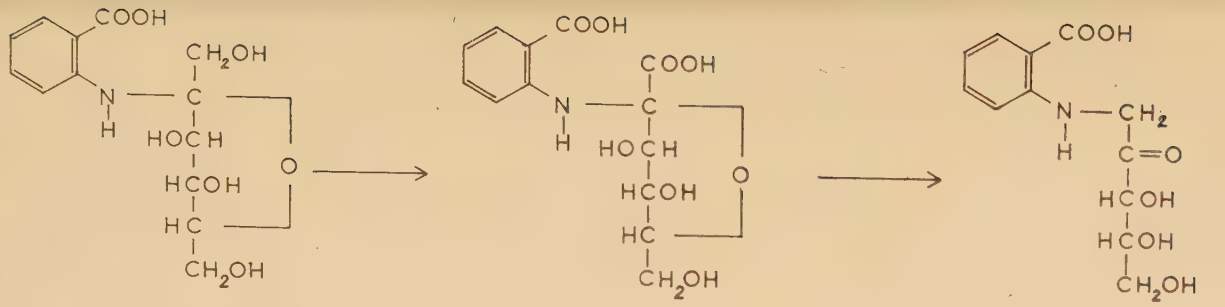
Als Vorstufe des Indolyl-glycerinphosphorsäureesters sind die Phosphorsäureester von N-(o-Carboxyphenyl)-ribosylamin und 1-(-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose (III) angenommen worden (84, 87). Kürzlich gelang nun Gibson und Mitarbeitern (110, 113) der Nachweis von 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose (III) bei den Aerobacter aerogenes-Mutanten N 3-33 und N 2-18 und der Escherichia coli-Mutante R 19-33.

Nimmt man an, daß 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose (III) aus N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamin (I) hervorgeht, so können drei Reaktionsschritte für diese Umwandlung postuliert werden. Formal sind eine Oxydation, eine Decarboxylierung und eine Oxydoreduktion an zwei benachbarten Kohlenstoff-Atomen ((Voigt-Umlagerung (114), im speziellen Fall Amadori-Umlagerung (108)) erforderlich.

1. Bei einer primären Oxydation von N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamin (I) würde zunächst ein Anthranilsäure-Derivat der 2-Keto-D-gluconsäure (II) entstehen. Dieses könnte durch Decarboxylierung in N-(o-Carboxyphenyl)-arabinosylamin übergehen, das anschließend durch Amadori-Umlagerung das Endprodukt 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose (III) ergäbe.

2. Die zweite Möglichkeit bestände in der Umlagerung des Anthranilsäure-Derivates der 2-Ketogluconsäure (II) zu 2-(o-Carboxyphenylamino)-2-desoxy-3-keto-D-gluconsäure (IV) die als ß-Ketosäure leicht durch Decarboxylierung in 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose (III) überginge.

3. Weniger wahrscheinlich ist eine primäre Voigt-Umlagerung von N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamin (I), deren Produkt bei nachfolgender Oxydation ebenfalls 2-(o-Carboxyphenylamino)-2-desoxy-3-keto-D-gluconsäure (IV) liefern würde.



N-(o-CARBOXYPHENYL)-FRUCTOSYLAMIN

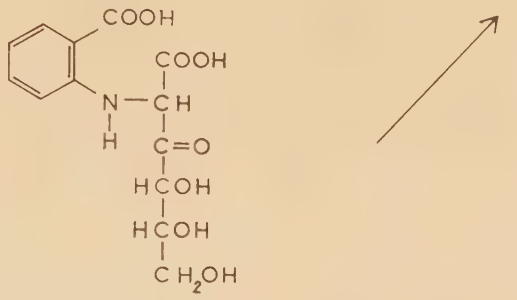
I

ANTHRANILSÄUREDERIVAT DER 2-KETO-D-GLUCONSÄURE

II

1-(o-CARBOXYPHENYL-AMINO)-1-DESOXYRIBULOSE

III



2-(o-CARBOXPHENYLAMINO)-2-DESOXY-3-KETO-D-GLUCONSÄURE

IV

ABB. 4

Zur Veranschaulichung sind die für Bakterien der Familie Enterobacteriaceae diskutierten Reaktionswege, die einem der obengenannten Biosynthesewege entsprechen würden, in Abb. 4 auf Seite 31 formelmäßig skizziert, wobei keine Entscheidung über die offene oder Ringstruktur der Zucker und Konfiguration am glykosidischen C-Atom getroffen werden soll.

4. Isolierung und Nachweis von 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyfructose bei Saccharomyces - Mutanten

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen gelang bei den oben beschriebenen Hefe-Mutanten H 19 und AE 7 die Isolierung zweier weiterer identischer Akkumulate; jedes Akkumulat erwies sich als ein Gemisch von Anthranilsäure und einer Anthranilsäure-Zucker-Verbindung, die durch Reduktion von alkalischer (Dichlorphenol-indophenol-Lösung oder Formazanbildung mit Triphenyltetrazolium-chlorid bei Raumtemperatur als Amadori-Produkt zu erkennen war (108, 109). Die andere Substanz war Anthranilsäure, wie durch vergleichende Papierchromatographie rasch festgestellt werden konnte. Die Reaktionen mit verschiedenen Zuckerreagentien wie Phloroglucin (118), Anthron (122) und Anilin/Phthalsäure deuteten darauf hin, daß es sich bei der unbekannten Substanz auch um eine Verbindung von Anthranilsäure und einem Ketozucker handeln müsse. Nach Säurehydrolyse der Verbindung konnte der Zuckeranteil als Fructose identifiziert werden. Die intakte Verbindung ergab immer die charakteristischen Erkennungsreaktionen der Amadori-Verbindungen (108, 109). Auf den Papierchromatogrammen fanden sich neben der ungespaltenen Verbindung jeweils auch der Zucker-

anteil und freie Anthranilsäure. Amadori-Verbindungen sind nach Literaturangaben ziemlich beständig. Bei der Anthranilsäure-Zucker-Verbindung vom Amadori-Typ scheint dagegen die Labilität der Verbindung ziemlich groß zu sein. Die Anthranilsäure ist vermutlich nicht als "echtes" Akkumulationsprodukt vorhanden, sondern tritt als Spaltstück der labilen Verbindung im Zuge der Aufarbeitung in Erscheinung.

Das Ergebnis eines Versuches, bei dem die Züchtung der Bakterien mit konstantem pH-Wert (6,8 - 7,2) der Nährlösung durchgeführt wurde, scheint die Annahme zu bestätigen. Wenn die natürliche Säuerung des Mediums wegfällt, ist später - rasche Aufarbeitung vorausgesetzt - auf dem Papierchromatogramm nur eine Verbindung zu finden, die Fluoreszenz und Zuckerreaktionen auf Fructose in sich vereint. Als Zinkkomplex konnte die Anthranilsäure-Zucker-Verbindung nicht erhalten werden (124).

5. Isolierung und Nachweis von N-(o-Carboxyphenyl)-sedoheptulosylamin bei Saccharomyces - Mutanten

Die tryptophanauxotrophe Hefe B 6 unterschied sich zunächst von den zwei anderen durch eine auffallend starke und schnelle Reaktion ihres Gesamtakkumulates mit spezifischen Reagentien auf Ketosen. Darüber hinaus zeigte sich bei der Papierchromatographie neben wenig Anthranilsäure ein nur langsam wandernder Fluoreszenzfleck mit kleinem R_f-Wert. Die Farbreaktion mit Phloroglucin deutete auf zwei mögliche Klassen von Zuckern

hin: Ketopentosen oder Ketoheptosen. Ketopentosen konnten rasch ausgeschlossen werden. Mit der Entdeckung des um ein C-Atom längeren Amadori-Produktes war entsprechend eine C_7-Zucker-Anthranilsäure-Verbindung zu fordern. Denn wenn in Anlehnung an das für Bakterien postulierte Reaktionsschema (Abb. 4, Seite 3 in dem eine Verkürzung der 6-C-Seitenkette des Zuckeranteils des N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamins (107) zur 5-C-Seitenkette des Amadori-Produktes von Gibson (110, 113) eintritt, so kann eigentlich bei analogem Ablauf der Reaktionen in der Hefezelle die Verkürzung zu einem C_6-Amadori-Produkt nur von einer Anthranilsäure-Heptulose-Verbindung ihren Ausgang nehmen.

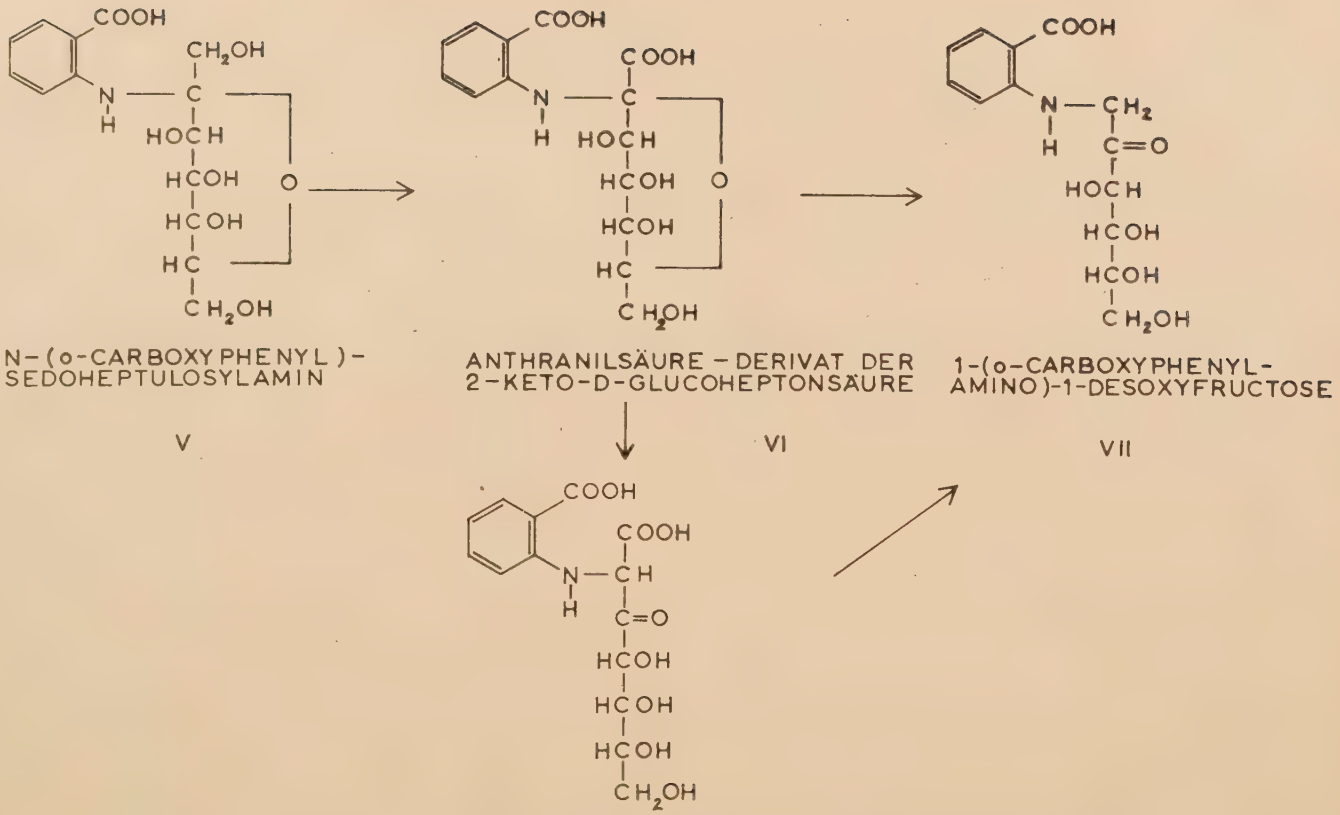
Hexosen und Heptosen lassen sich aber mit den meisten Fließmittelsystemen nicht oder nur unvollständig trennen. Erst im Durchlaufchromatogramm im System n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) gelang es, das Substanzgemisch befriedigend aufzutrennen. Im Leitchromatogramm mit verschiedenen Zuckern konnte bewiesen werden, daß es sich bei der Zuckerkomponente der zweiten Verbindung in der Tat um Sedoheptulose handelte. Auch im Kochromatogramm (= Startpunkt besteht aus unbekannter Substanz + Vergleichssubstanz) mit einer authentischen Probe von Sedoheptulose waren die beiden Zucker identisch. Nachdem eine positive Reaktion auf eine Anthranilsäure-Zucker-Verbindung vom Typ eines Amadori-Produktes nicht auftrat, wird angenommen, daß im Falle der Hefe-Mutanten in Analogie zur Synthesekette bei Bakterien neben 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyfructose auch N-(o-Carboxyphenyl)-sedoheptulosylamin als Akkumulat an das Nährmedium abgegeben wird (111).

Der Biosyntheseweg für die Hefen wäre in einem ähnlichen Schema zu sehen, bei dem aus N-(o-Carboxyphenyl)-sedoheptulosylamin (V) entweder zuerst ein Anthranilsäure-Derivat der 2-Keto-D-glucoheptonsäure (VI) oder aber 2-(o-Carboxyphenylamino)-2-desoxy-3-keto-D-glucoheptonsäure (VIII) entstehen würde. Im Falle des Derivates der 2-Keto-D-glucoheptonsäure (VI) könnte das Endprodukt 1-(-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyfructose (VII) durch Amadori-Umlagerung entstehen, im Falle der 2-(o-Carboxyphenylamino)-2-desoxy-3-keto-D-glucoheptonsäure (VIII) durch einfache Decarboxylierung dieser ß-Ketosäure. Durch Decarboxylierung und Wasserabspaltung würde in diesem Falle allerdings eine Indolverbindung mit einer 4-C-Seitenkette, nämlich Indolylerythrit bzw. dessen Phosphorsäureester (IX) entstehen. Siehe Abb. 5 Seite 36, 36a.

Durch weitere Untersuchungen an Mikroorganismen, insbesondere durch Arbeiten mit Fermentextrakten, lassen sich zweifellos weitere Tatsachen zu diesen hier diskutierten Schemata hinzufügen. Auch eine Isolierung von durch Mutanten akkumulierten Zwischenstufen liegt durchaus im Bereich der experimentellen Möglichkeiten.

6. Isolierung eines in seiner Struktur nicht aufgeklärten Zwischenproduktes der Tryptophan - Biosynthese bei Salmonella typhimurium

Um die genetische Zuordnung der Tryptophan-Mangelmutante try-8 von Salmonella typhimurium LT 2 zu sichern, wurden Wachstumsteste durchgeführt. Die Mutante wächst einwandfrei mit Indol



N-(o-CARBOXYPHENYL)-SEDOHEPTULOSYLAMIN

V

ANTHRANILSÄURE-DERIVAT DER 2-KETO-D-GLUCOHEPTONSÄURE

VI

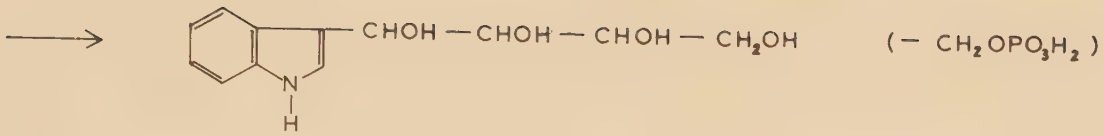
1-(o-CARBOXYPHENYL-AMINO)-1-DESOXYFRUCTOSE

VII

2-(o-CARBOXYPHENYLAMINO)-2-DESOXY-3-KETOGLUCOHEPTONSÄURE

VIII

ABB. 5

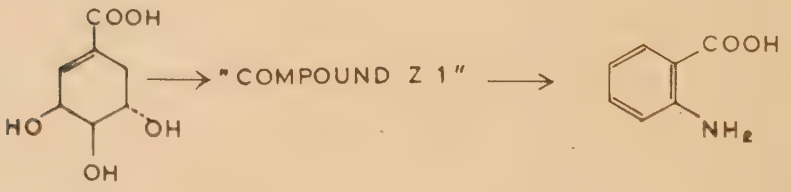


INDOLYL- ERYTHRIT (- PHOSPHORSÄURE)

IX

ABB. 5 FORTS.

oder Anthranilsäure als einzigem Wachstumfaktor an Stelle von Tryptophan. Ihr genetischer Block liegt demnach zwischen Shikimisäure bzw. "Compound Z 1" und Anthranilsäure. Mit Shikimisäure war kein Wachstum zu erzielen.
Zwischen Shikimisäure und Anthranilsäure ergeben sich folgende Reaktionsschritte:



SHIKIMISÄURE ANTHRANILSÄURE

ABB. 6

Aus dem Nährmedium der Mutante try-8 gelang es, durch Kohleadsorption und Papierchromatographie eine blaugrün fluoreszierende Substanz anzureichern, die papierchromatographisch weder mit Shikimisäure noch mit Anthranilsäure identisch ist. Sie lieferte ein charakteristisches UV-Spektrum, das mit den Spektren von Shikimisäure und Anthranilsäure nicht übereinstimmt. (Siehe Abb.7 Seite 38)

Die Prüfung auf funktionelle Gruppen der Shikimisäure und Anthranilsäure führte zu folgenden Ergebnissen:

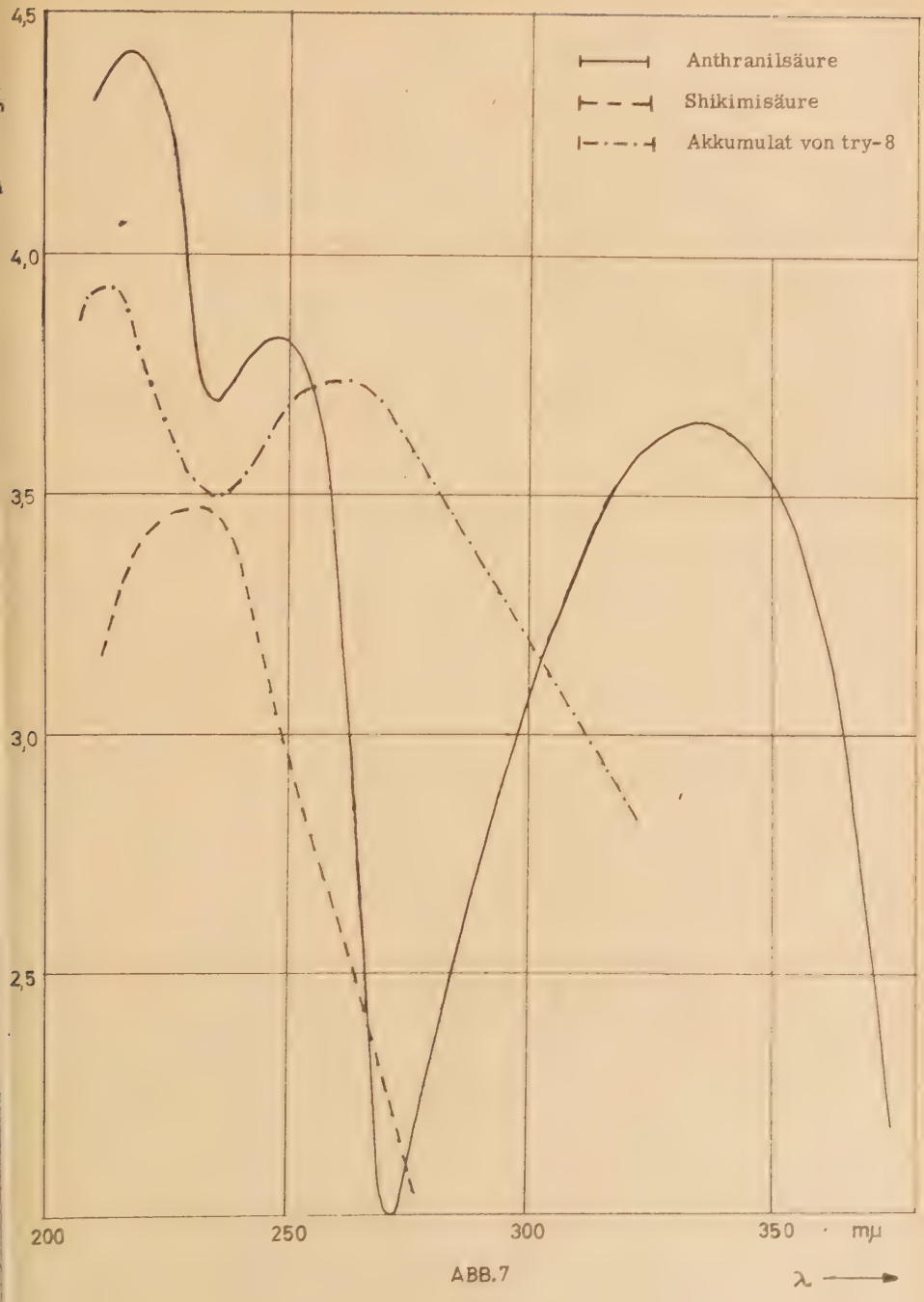

4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
200
250
300
350
mμ
λ
Anthranilsäure
Shikimisäure
Akkumulat von try-8

ABB.7

Während Shikimisäure mit Perjodat abgebaut wird, zeigt das Akkumulat keine Veränderungen des Spektrums bei entsprechender Behandlung; demnach enthält das Molekül keine benachbarten Hydroxylgruppen in dem für die UV-Absorption verantwortlichen System. Da die Farbreaktion mit 2,6-Dibromchinon-4-chlorimid für aromatische oder hydroaromatische Verbindungen negativ ausfiel, ist die Verbindung wahrscheinlich nicht aromatisch. Mehrere Mikro-Stickstoffbestimmungen zeigten deutlich das Vorhandensein von Stickstoff im Molekül. Es wurde jeweils mit Shikimisäure und Anthranilsäure als Vergleichssubstanz gearbeitet. Die Verbindung reduziert Triphenyltetrazolium-chlorid nach Erwärmen, was jedoch wahrscheinlich nicht auf einen Zuckeranteil zurückgeführt werden kann, da weder im intakten Molekül noch nach Säure- oder Alkalibehandlung mit anderen Zuckerreagentien ein Zuckeranteil nachweisbar war. Dagegen zeigt die Verbindung nach Kochen mit 1 n Salzsäure bzw. 2 n Natronlauge eine deutliche Veränderung des R_f-Wertes bei erhaltener Fluoreszenz. Die mit 2 n Natronlauge behandelte Substanz zeigt auch Veränderungen im UV-Absorptionsspektrum.(Siehe Abb. 8 Seite 40)

Eine Verbindung vom Typ der "Compound Z 1" müßte mit Eisen-3-chlorid-Reagenz eine Farbreaktion geben, die das Akkumulat nicht lieferte. Der Nachweis einer Säurefunktion mit Indikatorfarbstoffen gelang nicht, ebensowenig wie eine Mikrohydrierung im Warburg-Apparat. Das Akkumulat der Mutante try-8 lieferte mit Reineckesäure, Pikrinsäure, Hexanitro-diphenylamin oder Brucin keine Fällung. Nach Züchtung der Salmonella-Mutante try-8 in Gegenwart von radioaktivem anorganischen Phosphat ließ sich nach Lyse der Bakterien nachweisen, daß die an-

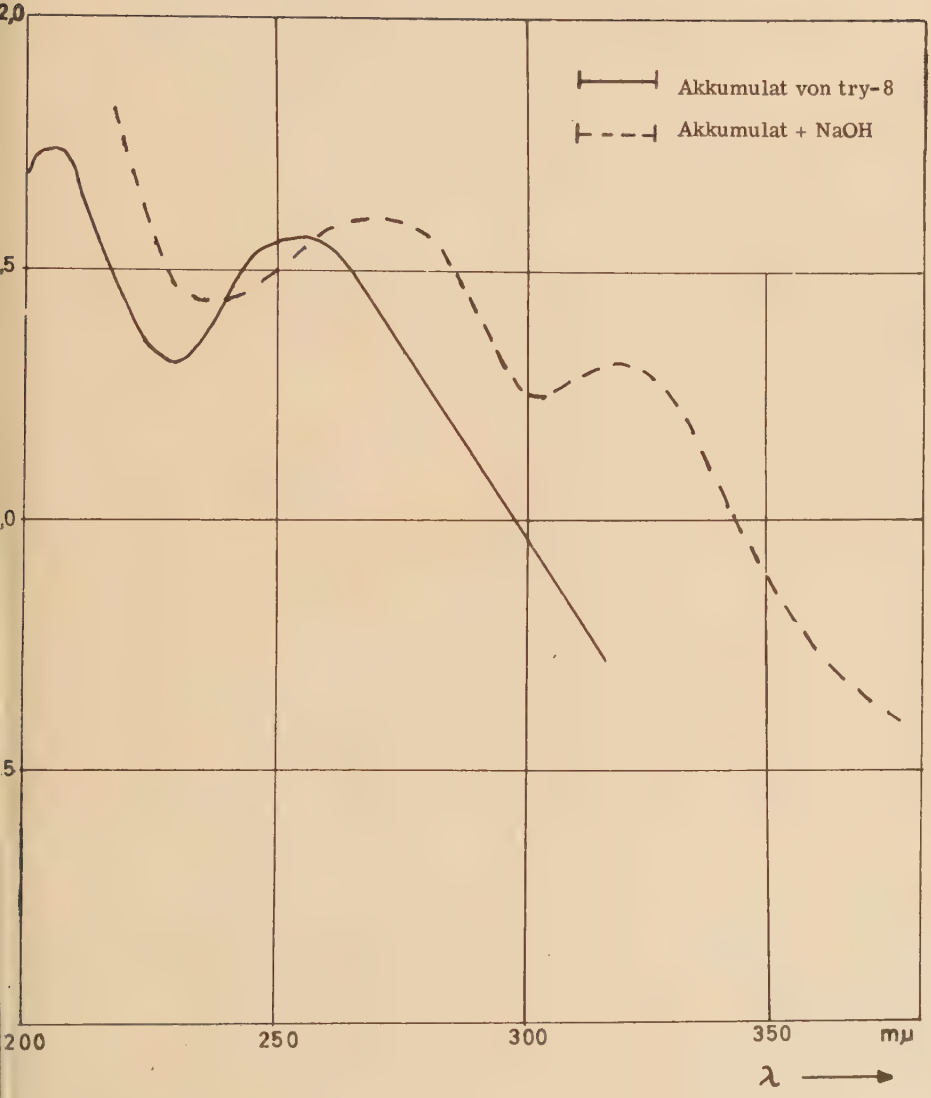


ABB. 8

gesammelte Verbindung im Zellstoffwechsel als Phosphorsäureester vorkommt, eine Tatsache, die für echte Zwischenprodukte einer solchen Biosynthesekette nach den Ergebnissen der Histidin-Synthese bei Neurospora und der Auffindung des Indolyl-glycerinphosphats gefordert werden kann.

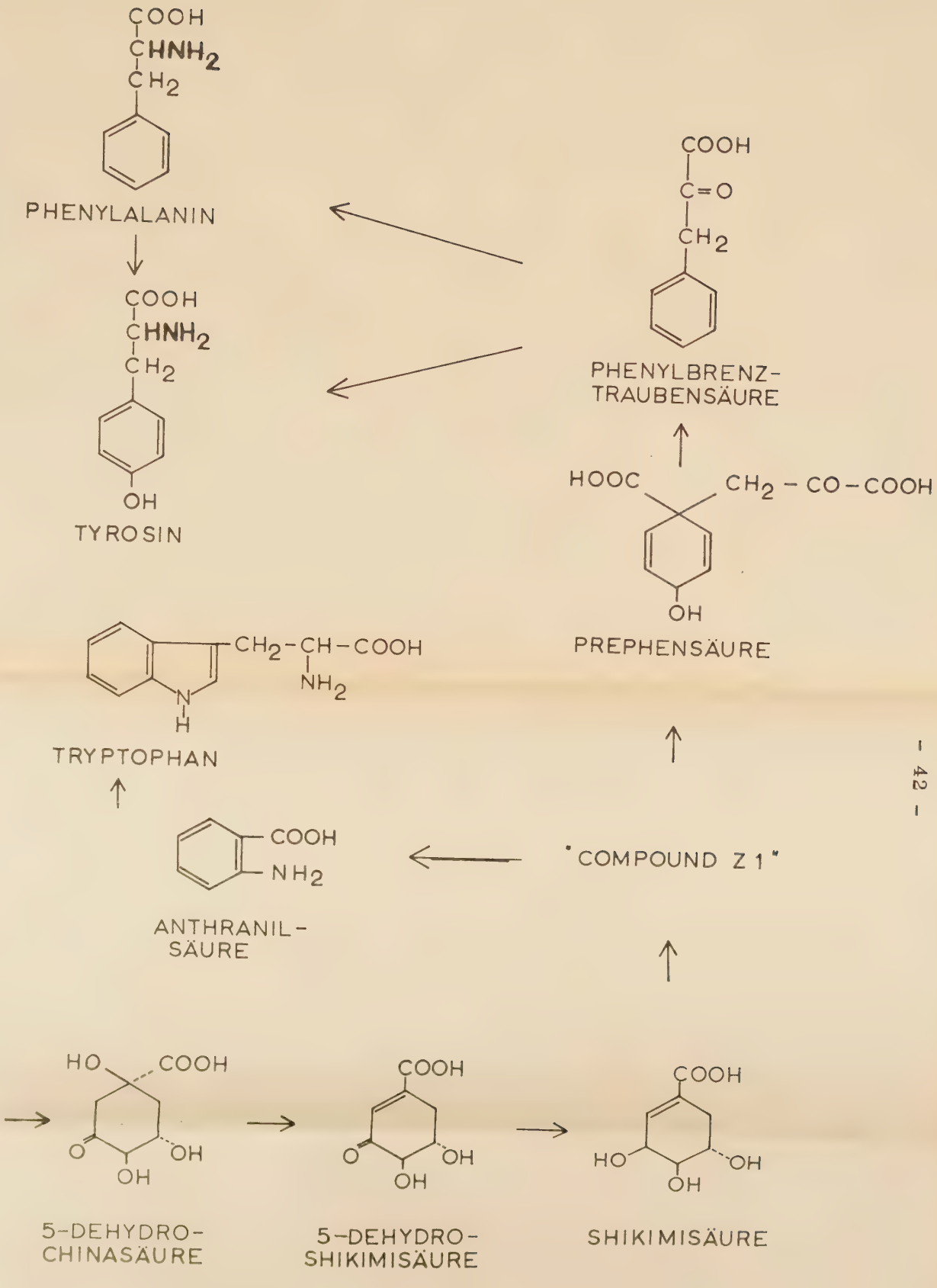


ABB.9 BIOSYNTHESE DER AROMATISCHEN AMINOSÄUREN

III. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Mikrobiologische Versuche

Stamm: Escherichia coli strain 15 (ATCC 9723) wurde auf Minimal-Agar-Röhrchen gehalten.

Kulturbedingungen: Die zur Bestrahlung benötigte Vorkultur wurde in der Weise hergestellt, daß 5 ml steriler Bouillion in einem sterilen Zentrifugenröhrchen mit Zellen des Colistammes beimpft wurden.

Bouillion = Nutrient broth (Difco)

Nutrient broth	8,0 g
NaCl	5,0 g
Dest. Wasser	1000 ml

Die Vorkultur wurde ca. 12 Stunden bei 37^{0} bebrütet, dann bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand unter Einhaltung steriler Bedingungen dekantiert und die Nährbrühe durch 5 ml einer sterilen Salzlösung (= Saline) ersetzt. Der gesamte Arbeitsgang wurde noch zweimal unter sterilen Bedingungen wiederholt.

Saline

NaCl	5,0 g
$MgSO_4$	0,12g
Dest. Wasser	1000 ml

Verwendete Zentrifuge: Wifug, Stockholm, Modell MIN

Bestrahlung: Von der erhaltenen Bakteriensuspension wurden 0,5 - 1,0 ml in eine sterile Petrischale pipettiert und unter ständigem Rotieren auf einem Drehtisch der UV-Strahlung 50 - 70 sec ausgesetzt. Sofort anschließend wurde die bestrahlte Suspension mit steriler Bouillion auf 5 ml verdünnt und eine Bebrütungsperiode von 12 Stunden bei 37^{o} zwischengeschaltet. Nach dieser Zeit wurde die Nährlösung durch Zentrifugieren entfernt und durch sterile Salzlösung ersetzt. Um syntrophische Effekte zu vermeiden (20), wurde dann eine Population von 10^{6} - 10^{7} Zellen in eine sterile Salzlösung gebracht, die 200 I.E. Penicillin/ml enthielt.

Strahlenquelle: Osram Entkeimungsstrahler HNS 12 mit Drosselspule Osram Type 3-10 W. Als Hauptanteil wird von diesem Gerät kurzwelliges UV-Licht von 253,7 nm emittiert.

Agar-Substrate:

Minimal-Medium (103)

K_2HPO_4	7,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	2,0 g
$MgSO_4$	0,2 g
Glucose	2,0 g
Agar	40,0 g
Dest. Wasser	2000 ml
pH 6,8	

Komplett-Medium

Nutrient broth (Difco)	30,0 g
Minimal-Medium	2000 ml

Nachdem die Bakterienzellen 12 Stunden in der Penicillinlösung verblieben waren, wurden 0,5 ml der Bakteriensuspension steril mit einer Pipette entnommen. Davon wurden Verdünnungen 1:10 bis 1:1 000 000 mit steriler Saline hergestellt und 1 ml jeweils in Petrischalen mit sterilem Komplettagar ausgeplattet. Nach 15, 18 und 20 Stunden wurde dieser Vorgang in identischer Weise wiederholt. Die beimpften Platten wurden 24 Stunden bei 37^{o} bebrütet. Nach der Bebrütung wurden die Platten ausgewählt, die nicht zu dicht bewachsen waren und bis zu 100 Einzelkolonien aufwiesen.

Auswertung der Plattenversuche

Von den brauchbaren Komplettplatten wurden mit dem "Lederberg-Stempel", einem mit sterilem feinen Samt überzogenem zylindrischen Holzklotz, vorsichtig Abdrücke in je eine Petrischale mit Minimalagar oder Komplettagar gemacht. Die Platten wurden wieder 24 Stunden bei 37^{o} bebrütet. Nach der Bebrütung wurde durch Vergleich unter dem Plattenmikroskop die auf der Komplettplatte zusätzlich zu den überlebenden Wildformen gewachsenen Defektmutanten ermittelt. Von diesen Mutanten-Kolonien wurden auf Minimal- und Komplettplatten Ausstriche gemacht, inkubiert wurde 48 Stunden. Der Strichtest sollte im Verlauf von 48 Stunden eventuell auftretenden Rückmutationen erkennen lassen. Die erhaltenen Mutanten wurden in Bouillion-Röhrchen abgeimpft.

Nach 12 stündiger Bebrütung wurden die Bakteriensuspensionen 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Nährlösung durch sterile Kochsalzlösung ersetzt. Der Vorgang wurde zweimal in gleicher Weise wiederholt. Von den so erhaltenen Bakterienaufschwemmungen wurde jeweils 1 ml in eine sterile Petrischale pipettiert, 15 ml 45° warmer Minimalagar hinzugefügt und die Bakterien durch Rotieren der Petrischale in dem noch flüssigen Agar gleichmäßig verteilt.

Identifizierung des Bedarfs der Mutanten

Zur Austestung wurden aus Filtrierpapier ausgestanzte runde Blättchen (Durchmesser 5 mm) mit Lösungen, die jeweils mehrere essentielle Wuchsstoffe enthielten, getränkt und getrocknet. Eine Lösung mit 5-6 Wuchsstoffen wurde in Analogie zur englischen Nomenklatur "Pool" genannt.

Verzeichnis der Poole

Pool AA 1 (Amino Acids)
L-Cystin
L-Methionin
L-Arginin
L-Lysin
Cobalamin (Vit.B_{12})

Pool AA 2 L-Leucin
L-Isoleucin
L-Valin

Pool AA 3 L-Tyrosin
L-Phenylalanin
L-Tryptophan
p-Aminobenzoesäure
Pyridoxin HCl
Nicotinsäureamid

Pool AA 4 L-Histidin
L-Threonin
L-Prolin
L-Hydroxyprolin
L-Glutaminsäure

Pool AA 5 L-Serin
L-Glycin
L-Alanin
L-Asparaginsäure

Pool PP (Pyrimidin-Purin)
Guanin
Uracil
Adenin
Cytosin

Pool V (Vitamine)
Aneurin
Riboflavin
Ca. pantothenat
Biotin
Folsäure
Inosit

Auf den erstarrten Agar wurde von jedem Pool ein Blättchen gelegt und die Petrischale bei 37° bebrütet. Meist waren schon nach 6 bis 8 Stunden Kolonien um eines der Blättchen zu erkennen, die sich nach weiterer Bebrütung zu einem Wachstumsring angeordnet hatten. Die besonders interessierenden Mutanten aus Pool 3, dem "aromatischen Pool", wurden weiter unter Zuhilfenahme einer ähnlichen Technik auf ihren spezifischen Wuchsstoffbedarf ausgetestet, wobei Kristalle der aromatischen Aminosäuren und Vitamine die Papierblättchen ersetzten.

Zur weiteren Sicherung der Differenzierung der Mutanten wurden die Teste auch in flüssigem Minimalmedium unter Zusatz der verschiedenen in Pool 3 enthaltenen Wuchsstoffe durchgeführt. Die vier unabhängig voneinander isolierten Tryptophanmangel-Mutanten vom Stamm Escherichia coli 15 akkumulierten alle Indol in ihrem Nährmedium und wurden in andere Untersuchungen einbezogen, in denen auch ihre Eigenschaften beschrieben sind (87, 115).

Die Verteilung der in dieser Serie von Bestrahlungsversuchen gewonnenen Mutanten war wie folgt:

Gesamt	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool PP
302	41	4	5	108	35	4

Pool V
2

Rückmutationen	Komplexer Bedarf	Pool 1+5	Pool 1+PP
48	48	5	2

Auffallend groß war die Anzahl von Mutanten, die mit keinem in einem der Poole befindlichen Stoffe wuchsen, sondern lediglich auf Komplettmedium. Es kann sich hier z.B. um einen Bedarf an unbekannten Wachstumsfaktoren handeln oder vielleicht um einen Bedarf an niedermolekularen Peptiden vom Typ der Strepogenine. Näher identifiziert wurden u.a. 4 Tryptophan-Mangelmutanten, 4 Valin + Isoleucin-Mutanten, 6 Histidin-Mangelmutanten, 1 Mutante mit Prolin-Bedarf, 2 Aneurin-Mangelmutanten.

Aus der Sammlung des Max-Planck-Institutes für Virusforschung Tübingen standen die Mutanten try-8, try-14 und try-16 vom Salmonella typhimurium-Wildstamm LT 2 zur Verfügung.

Ein großer Teil der Untersuchungen konnte an den Tryptophan-Auxotrophen H 19, B 6 und AE 7 des Saccharomyces cerevisiae-Stammes S 288 C durchgeführt werden. Sie entstammen dem Donner Laboratory of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, Calif., U.S.A. +

Züchtung der Salmonella - Mutanten

Die Stammkulturen der Salmonella typhimurium-Mutanten try-8, try-14 und try-16 wurden auf NBS-Agar gehalten und alle vier Wochen auf frische Agarröhrchen übergeimpft.

+ Für die freundliche Überlassung der oben genannten Tryptophan-Mangelmutanten danke ich den Herren Priv.Doz.Dr.F. Kaudewitz und Dr.W. Vielmetter, Tübingen sowie Herrn Dr. R.K. Mortimer, Berkeley.

NBS-Agar (Nutrient Broth Slants)

Nutrient broth (Difco)	15,0 g
NaCl	5,0 g
Agar (Difco)	25,0 g
Dest. Wasser	1000 ml

Zur Gewinnung von Akkumulaten der Salmonella-Mutanten wurde als Substrat das Minimalmedium ohne Agar verwendet, das für try-14 und try-16 in der Weise modifiziert wurde, daß an Stelle von Glucose 4 g Natriumcitrat/Liter Nährlösung als C-Quelle zugesetzt wurde. Die zugesetzte Tryptophanmenge betrug 1 γ L-Tryptophan/ml (115). In einzelnen Versuchsreihen wurde auch mit 4 g Natriumcitrat + 4 g Natriumsuccinat/Liter Minimalmedium sowie 2 γ L-Tryptophan/ml gezüchtet.

Die Stammkulturen der Saccharomyces-Stämme wurden auf YEPD-Agar gehalten, die Kulturen wurden in Intervallen von vier Wochen übergeimpft.

YEPD-Agar (= Yeast Extract Peptone Dextrose-Agar)

Yeast Extract (Difco)	1,0 g
Peptone (Difco)	1,0 g
Glucose	2,0 g
Agar	2,0 g
Dest. Wasser	100 ml

Züchtung der Saccharomyces - Mutanten

Zur Gewinnung der akkumulierten Stoffwechselprodukte wurde in einem modifizierten Medium nach Wickerham (33) gezüchtet.

Wickerham's Medium, modifiziert

KH_2PO_4	0,875 g
K_2HPO_4	0,125 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,5 g
NaCl	0,1 g
$CaCl_2$	0,1 g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
Glucose oder Saccharose	10,0 g
H_3BO_3	0,50 mg
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,04 mg
KJ	0,10 mg
$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	0,20 mg
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,40 mg
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	0,40 mg
$(NH_4)_5(HMO_6O_{21}) \cdot 3\ H_2O$	0,20 mg
Dest. Wasser	1000 ml
pH 6.0	

Zugesetzt wurde außerdem 1 γ L-Tryptophan/ml.

2. Isolierung von N-(o- Carboxyphenyl)- fructosylamin

Literflaschen mit je 500 ml Minimalmedium wurden 20 min bei 1 Atmosphäre sterilisiert; Tryptophan wurde getrennt aus steriler Lösung zugefügt, um Bräunung des Substrats und Trypto-

phanverlust zu vermeiden. Die Flaschen wurden mit 10^4 Zellen von Salmonella typhimurium try-14 bzw. try-16/ml Nährlösung beimpft.

Die Impfsuspension war aus einer 12-Stunden-Kultur in Bouillion durch Verdünnen der abzentrifugierten Bakterien mit steriler Kochsalzlösung gewonnen worden. Eine Bebrütungsperiode von 40 Stunden bei 37^0 schloß sich an, nachdem in früheren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe ermittelt worden war, daß bei Züchtung mit 1 γ L-Tryptophan/ml das Akkumulations-Maximum nach 36 bis 48 Stunden Bebrütungszeit erreicht war (115). Nach 10 bis 12 Stunden begann die Nährlösung eine blaue Fluoreszenz zu zeigen. Nach Ende der Bebrütung wurde die Hauptmenge der Bakterien durch Zentrifugieren abgetrennt und der Überstand durch ein bakteriendichtes Membranfilter filtriert. Das Filtrat wurde sofort auf eine Säule von Darco G 60 gegeben, wobei die fluoreszierenden Stoffe an die Kohle adsorbiert wurden. Die Kohlesäure wurde mit reichlich destilliertem Wasser nachgewaschen, dann stufenweise mit 50, 70, 95-proz. Alkohol und Äther eluiert. Die fluoreszierenden Verbindungen traten erst mit Äther aus der Säule aus, die dann erschöpfend eluiert wurde. Das Eluat wurde bei Zimmertemperatur im Vakuum fast bis zur Trockene eingeengt. Zurück blieb eine farblose bis gelbe, im UV-Licht stark fluoreszierende Flüssigkeit. Zur Ermittlung der akkumulierten Verbindung und weiteren Reinigung wurde auf- und absteigende Papierchromatographie in verschiedenen Fließmittelsystemen und mit verschiedenen Papiersorten angewandt.

Bei der aufsteigenden Papierchromatographie auf Schleicher und Schüll-Papier 2043b im System n-Butanol-3-proz. Ammoniak (1:1) trennte sich das Gesamtakkumulat in zwei unter der Analysenquarzlampe blau fluoreszierende Substanzen. Sie hatten die R_f-Werte 0,20 bis 0,22 und 0,65 bis 0,71. Die Substanz mit dem niederen R_f-Wert erwies sich als identisch mit Anthranilsäure im Leitchromatogramm wie auch im Kochromatogramm. Die schneller laufende Verbindung war mit N-(o-Carboxyphenyl)-ribosylamin (87), -glucosylamin oder arabinosylamin nicht identisch. Im Fließmittelsystem Methyläthylketon-Aceton-Wasser (3:1:0,6) hatte Anthranilsäure den R_f-Wert 0,96, die unbekannte Substanz 0,75. Im 80-proz. n-Propanol hatte Anthranilsäure den R_f-Wert 0,78 bis 0,80, unsere Verbindung 0,40. Von der mit reinstem Alkohol aus dem Papier extrahierten Substanz wurde ein UV-Spektrum gemessen, aus dem auf eine mit Anthranilsäure verwandte Struktur geschlossen werden konnte.

Zur Charakterisierung der Verbindung wurden Farbreaktionen herangezogen. Der Test auf diazotierbare Amine mit Bratton-Marshall-Reagenz war schwach positiv (116). Nach Besprühen der Papierchromatogramme mit Ehrlichs Reagenz entstand eine dunkelgelbe Färbung des Substanzfleckes. Die Ninhydrin-Reaktion war negativ. Reaktionen auf aromatische Hydroxy- und Dihydroxysäuren mit 2,6-Dibromchinon-4-chlorimid oder Silbernitrat verliefen negativ (117). Ebenfalls negativ waren Reaktionen auf Pentosen mit Phloroglucin-Reagenz nach Dische (118). Aus dem Papierchromatogramm extrahiertes Material gab einen positiven Test auf Ketozucker mit Carbazol-Reagenz (119) und reduzierende Zucker mit 2,3,5-Triphenyltetrazolium-chlorid (120, 121).

Extrahiertes Material wurde mit 10 ml 2 n HCl versetzt und im Wasserbad auf 98° unter Rückfluß erhitzt. Nach einer Stunde wurde im Vakuum zur Trockene eingeengt, mehrmals mit destilliertem Wasser versetzt und erneut zur Trockene gebracht. Der Rest wurde mit Natronlauge neutralisiert und erneut chromatographiert. Nach salzsauerer Hydrolyse gelang es auf dem Chromatographiestreifen neben freier Anthranilsäure Fructose mit Anilin/Phthalsäure und der spezifischen Reaktion auf Ketozukker mit Anthron (122) nachzuweisen. Eisen-3-chlorid gab ebenfalls keine Reaktion. Als spezifischer Test auf Amadori-Umlagerungsprodukte wurden folgende Reagentien angewendet:

2,6-Dichlorphenol-indophenol in 0,1 n alkalischen Milieu, alkalisches Triphenyltetrazolium-chlorid und Methylenblau-Reduktion bei Zimmertemperatur ohne Erhitzen (109, 123). Alle diese Reaktionen verliefen negativ und schlossen somit die Anwesenheit eines Amadori-Umlagerungsproduktes aus.

Es wurde der Versuch gemacht, die natürliche Säuerung der Nährlösung, die im Verlauf der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien eintritt, auszuschalten, um das Akkumulationsprodukt nicht der Säureeinwirkung auszusetzen. Dazu wurden 2000 ml Minimalmedium + 1 γ L-Tryptophan/ml mit 6 mg Bromthymolblau/Liter versetzt (44). Es wurde in der üblichen Weise sterilisiert und mit Zellen der Mutante try-14 beimpft. Zu Beginn der Bebrütungsperiode war die Nährlösung dunkelgrün gefärbt, nach etwa 12 Stunden trat eine Farbänderung nach hellgrün ein. Das Nährsubstrat wurde nun mit 1 n Natronlauge unter Umrühren mit einem Magnetrührer auf dunkelgrüne Farbe gebracht (= pH 6,8 bis 7,2). Noch

zweimal war im Verlauf der Bebrütung Zusatz von Lauge erforderlich, um die gebildete Säure zu neutralisieren, in der Endphase war keine weitere Säuerung festzustellen. Die Akkumulation schien durch den Farbstoffzusatz nicht beeinträchtigt zu sein.

Die Nährlösung wurde in der oben beschriebenen Art sehr rasch aufgearbeitet und chromatographiert. Dabei trat nur noch ein fluoreszierender Fleck mit R_f-Wert 0,65 bis 0,71 im System n-Butanol-3-proz. Ammoniak (1:1) auf, der auch die Fructose-Reaktion mit Phloroglucin, Anthron und Triphenyltetrazoliumchlorid gab. Beim Stehenlassen bei Zimmertemperatur oder auch in der Kälte trat aber sehr bald wieder Zersetzung der Verbindung in Fructose und Anthranilsäure ein, wie später gelaufene Chromatogramme deutlich zeigten.

3. Isolierung von 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyfructose

Literflaschen mit je 500 ml sterilem Minimalmedium nach Wickerham und 1 γ L-Tryptophan/ml wurden mit je 1 ml einer dichten Hefesuspension, die einer 12 Stunden alten Kultur in flüssigem YEPD-Medium entnommen war, beimpft. Anschließend wurde 40 Stunden bei 37° bebrütet. Die Impfsuspension war durch dreimaliges Zentrifugieren und Waschen mit steriler Saline der Übernachtkultur in YEPD-Medium gewonnen worden. Ein normaler Ansatz bestand aus 4 Liter Nährlösung. Auch hier wurde nach ca. 12 Stunden eine blau fluoreszierende Verbindung an das Nährmedium abgegeben.

Nach Beendigung der 40 stündigen Bebrütung wurde die Nährlösung 20 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand zur Entfernung der restlichen Hefezellen durch ein bakteriendichtes Membranfilter filtriert. Das Filtrat wurde sofort durch eine Säule von Darco G 60 filtriert, wobei die fluoreszierende Verbindung an der Kohle zurückgehalten wurde. Die Säule wurde mit reichlich destilliertem Wasser und stufenweise mit 50, 70 und 95-proz. Alkohol nachgewaschen und die fluoreszierende Substanz mit Äther eluiert. Die Elution wurde solange durchgeführt, bis im ausfließenden Eluat im UV-Licht keine Fluoreszenz mehr zu beobachten war. Das Eluat wurde im Wasserstrahlvakuum bis auf ein kleines Volumen eingeengt (ca. 0,5 bis 1 ml). Es blieb eine meist gelb gefärbte, im UV-Licht sehr stark fluoreszierende Flüssigkeit zurück. Das konzentrierte Eluat wurde auf Streifen von Schleicher und Schüll 2043b im Fließmittelsystem n-Butanol-3-proz. Ammoniak (1:1) aufsteigend chromatographiert. Das Eluat trennte sich hierbei in zwei im UV-Licht fluoreszierende Substanzen, R_f-Wert 0,20 bis 0,22 und 0,34 bis 0,35. Auch hier wurde, wie bei der Isolierung des N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamins bei Salmonella, neben dem Anthranilsäure-Zucker-Konjugat freie Anthranilsäure und außerdem freie Fructose gefunden. Die Verbindung mit dem R_f-Wert 0,34 bis 0,35 war Anthranilsäure. In 80-proz. n-Propanol wurde für die freie Anthranilsäure ebenfalls wieder R_f-Wert 0,77 bis 0,80 gefunden, die unbekannte Verbindung hatte R_f-Wert 0,60. Die unbekannte Verbindung war Ninhydrin-negativ, reagierte nicht mit Ehrlichs Reagenz, Eisen-3-chlorid-Lösung, Silbernitrat oder 2,6-Dibromchinon-4-chlorimid (117), zeigte positive Reaktionen mit Bratton-Marshall-Reagenz (116).

Nach Besprühen mit Zuckerreagentien und Entwickeln der Chromatographiestreifen reagierte unsere Verbindung mit Phloroglucin (118) auf Ketohexosen unter Bildung eines gelbbraunen Farbflekkes, daneben wurde ein weiterer farbidentischer Fleck mit abweichendem R_f-Wert gefunden. Mit Anthron, einem spezifischen Reagenz auf Ketozucker (122), wurden zwei leuchtend gelbe Flecke entwickelt, von denen der eine ebenfalls mit dem Fluoreszenzbereich der gesuchten Verbindung zusammenfiel. Offenbar ging die Aufspaltung der Verbindung auch während der Laufzeit der Chromatogramme weiter, weshalb auch stets "freie" Anthranilsäure gefunden wurde. Chromatogramme der Eluate, die gleichzeitig mit Lösungen von Vergleichszuckern gelaufen waren, zeigten, daß der nicht mit der fluoreszierenden Verbindung identische Zucker Fructose war, die aus der Verbindung abgespalten worden war. Bei der Verbindung handelt es sich demnach einwandfrei um ein Zuckerderivat der Anthranilsäure, da diese Verbindung einerseits die Fluoreszenz besaß, andererseits die Zuckerreaktionen für Ketozucker bzw. Ketohexosen gab.

Das Zuckerderivat der Anthranilsäure, das im Nährmedium der Saccharomyces-Mutanten H 19 und AE 7 akkumuliert wurde, gab aber, im Gegensatz zu dem bei Salmonella typhimurium gefundenen Zwischenprodukt der Tryptophansynthese, mehrere spezifische Reaktionen auf Amadori-Produkte (108, 109).

Zur Reaktion mit Triphenyltetrazolium-chlorid wurde das getrocknete Chromatogramm mit einer frisch bereiteten 2-proz. Lösung von Triphenyltetrazolium-chlorid in Chloroform besprüht,

anschließend mit einer 1 n alkoholischen Kalilauge (123). Nach einigen Minuten bei Zimmertemperatur entwickelte sich ein roter Fleck von Triyphenyl-formazan bei der Anthranilsäure-Zuckerverbindung. Dichlorphenol-indophenol in alkalischem Milieu (1 n alkoholisches Kaliumhydroxyd) wurde bei Zimmertemperatur unter Entfärbung reduziert. Im Reagenzglas reduzierte die aus dem Papier extrahierte Verbindung alkalische Methylenblau-Lösung ebenfalls in kurzer Zeit.

Eine kleine Menge des Akkumulates wurde in 10 ml Methanol gelöst, filtriert und das Filter mit einigen Tropfen Methanol nachgewaschen. Dann wurde eine gesättigte methanolische Lösung von Zinkacetat tropfenweise zugesetzt. Weder unmittelbar nach Zusatz von Zinkacetat noch nach längerem Stehenlassen konnte eine Fällung beobachtet werden (124).

4. Isolierung von N-(o-Carboxyphenyl)-sedoheptulosylamin

Die Hefemutante B 6 unterschied sich von den beiden anderen zunächst durch auffallend starke und schnelle Farbreaktion mit Carbazol-Cystein-Schwefelsäure (119) auf Ketozucker, außerdem zeigte sich auf dem Papierchromatogramm im System n-Butanol-3-proz. Ammoniak neben wenig Anthranilsäure ein nur wenig beweglicher Fluoreszenzfleck mit R_f-Wert 0,09. Man erhielt dort eine sehr kräftige Reduktion von Triphenyltetrazolium-chlorid und eine grüngelbe Mischfarbe mit Phloroglucin (118), wobei vor allem der obere Teil des Farbflecks grünlich gefärbt war. Nach Literaturangaben reagieren zwei Arten von Zuckern etwa in die-

ser Art. Ketopentosen geben eine dunkelgrüne, Ketoheptosen eine hellgrüne Anfärbung. Vermutlich handelt es sich um einen zweiten reduzierenden Zuckerbaustein.

Mit verschiedenen Steigflüssigkeiten, sechs verschiedenen Mischungsverhältnissen von Pyridin-Wasser, wassergesättigtem Phenol, Pyridin-Eisessig-Wasser (3:2:1,5) und dem sonst für Zucker äußerst günstigen System Methyläthylketon-Aceton-Wasser (3:1:0,6) gelang es nicht, das von der Mutante B 6 akkumulierte Gemisch sowohl in auf- als auch in absteigender Technik besser aufzutrennen. Erst im Durchlaufchromatogramm über 20, mitunter bis zu 80 Stunden im frischbereiteten Fließmittelsystem n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) gelang eine Auftrennung in drei fluoreszierende Zonen, von denen neben Anthranilsäure zwei Zuckerreaktionen gaben. Mit Phloroglucin (118) erhielt man nun einen gelbbraunen und einen grünlichen Farbfleck.

Im Leitchromatogramm mit Vergleichszuckern konnte der Nachweis geführt werden, daß neben einer Anthranilsäure-Fructose-Verbindung auch eine Anthranilsäure-Sedoheptulose-Verbindung vorlag.+ Neben der Farbreaktion mit Phloroglucin konnte Sedoheptulose auch durch seine blaue Farbreaktion mit Orcin nachgewiesen werden (125). Nach Hydrolyse des Materials gaben sich durch R_f-Wert und die oben beschriebenen Farbreaktionen wieder Anthranilsäure und Sedoheptulose zu erkennen. Die Verbindung zeigte sich in-

+ Herrn Professor H.O.L. Fischer, Dept. of Biochemistry, University of California, Berkeley, danke ich für die Überlassung einer Probe von Sedoheptulose.

different gegenüber den Reaktionen auf Amadori-Produkte. Es darf auf Grund der papierchromatographischen Befunde angenommen werden, daß von der Tryptophan-Mangelmutante B 6 von Saccharomyces cerevisiae Stamm S 288 C neben hauptsächlich 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyfructosylamin wenig N-(o-Carboxyphenyl)-sedoheptulosylamin als Zwischenprodukt der Tryptophan-Synthese angesammelt wird.

5. Isolierung des Akkumulates von Salmonella typhimurium try-8

Vorversuche ergaben, daß im Nährmedium von Salmonella typhimurium try-8 eine blaugrün fluoreszierende Verbindung unter geeigneten Versuchsbedingungen auftrat.

Zur Gewinnung des Akkumulates in größerer Menge wurde die Mutante in dem beschriebenen Minimalmedium (103) mit Glucose unter Zusatz von 1 γ L-Tryptophan/ml (115) gezüchtet. Nach einer Bebrütungsdauer von 40 Stunden wurden die 2 bis 4 Liter betragenden Ansätze zentrifugiert, vom Bodenkörper, der die Hauptmenge der Bakterienzellen enthielt, dekantiert und sofort anschließend zur Erzielung einer bakterienfreien Lösung durch ein Membranfilter filtriert. Die Lösung wurde lyophilisiert, und der Salzrückstand mit absolutem Äther oder absolutem Alkohol extrahiert. Die Extrakte wurden auf ein kleines Volumen eingeengt und papierchromatographiert. Sie ließen aber durch Schwanzbildung und andere Schmutzeffekte keine klare Interpretation

zu; bei der Extraktion der Salzrückstände wurden offensichtlich zu große Mengen anorganischer Salze sowie Produkte des Bakterienstoffwechsels in die Lösungsmittel aufgenommen. Die Aufarbeitungsmethode wurde dann in der Weise variiert, daß eine Reinigung der Substanz durch Adsorption an Aktivkohle Darco G 60, Waschen der Kohlesäule mit reichlich destilliertem Wasser und 50, 70 und 95-proz. Alkohol, Desorbierung der Substanz mit wässrigem, destilliertem Aceton vorgenommen wurde. Anschließend wurde das eingeengte Eluat aufsteigend im System Methanol-Wasser (1:1) chromatographiert. Unter der Analysenquarzlampe zeigte sich nur ein einziger hellblau fluoreszierender Substanzfleck mit R_f-Wert 0,78. Die Substanz wurde mit reinstem Alkohol aus dem Papierchromatogramm extrahiert und im UV-Spektrometer Zeiss Typ PMQ II ein Spektrum aufgenommen. Die Absorptionsmessungen wurden nach Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge wiederholt. Aus zwei Papierchromatogrammen, die im System Methanol-Wasser (1:1) gelaufen waren, wurden die fluoreszierenden Flecke ausgeschnitten; als Nullwert diente ein gleich großes Stück Papier, das nur mit den Fließmitteln in Berührung gekommen war. Über Nacht wurden die Papierstücke mit Alkohol für spektralanalytische Zwecke eluiert, der Nullwert wurde auf 5 ml, die Substanzlösung von try-8 auf 20 ml aufgefüllt. Nullwert und je 5 ml des Konzentrates von try-8 wurden dann in trockene, gewogene Kölbchen gegeben, eingeengt und über Nacht im Exsikkator im Vakuum getrocknet. Nach erneuter Wägung wurden je 2,5 ml n Salzsäure bzw. 2,5 ml n Natronlauge zugegeben, der Rückstand wurde zuerst mit etwas Alkohol aufgenommen. Ein Kölbchen von try-8 wurde mit n Salzsäure, das andere mit n Natronlauge auf 5 ml aufgefüllt, anschließend wurde die Messung durchgeführt. Nach 6 Stunden

wurde die Messung wiederholt, ebenfalls nach 3 wöchigem Stehenlassen.+ Die Spektren sind in der Abbildung 8 Seite 40 wiedergegeben.

Eine kleine Menge des Akkumulates von try-8 wurde in 1 n Natronlauge gelöst und im Wasserbad unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, nach einer Stunde wurde neutralisiert und die klare Lösung im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt. Nach aufsteigender Chromatographie im System Methanol-Wasser (1:1) zeigte es sich, daß zwar die Fluoreszenz erhalten geblieben war, die Substanz sich aber vor und nach der Behandlung mit Natronlauge papierchromatographisch verschieden verhielt. R_f-Wert unbehandelt 0,79, R_f-Wert nach Natronlaugenbehandlung 0,53. Nach 1 stündigem Erhitzen mit 2 n Salzsäure ergab sich für das Akkumulat ein ähnliches Bild. Die Fluoreszenz war erhalten geblieben, die R_f-Werte waren deutlich voneinander verschieden. Für die unbehandelte Verbindung wurde ein R_f-Wert von 0,72 gefunden, nach Erhitzen mit Salzsäure 0,57.

Zur Charakterisierung der unbekannte Substanz kamen weitere Reaktionen zur Anwendung. Die Spaltung mit Natriumperjodat lieferte keine Änderung des Spektrums, im Parallelversuch wurde eine Probe von Shikimisäure glatt gespalten. Zu einem aliquoten Teil der akkumulierten Verbindung in alkoholischer Lösung wurde in der Küvette 0,1 ml gesättigte Natriumperjodatlösung und ein Tropfen verdünnte Essigsäure zugesetzt und die Reaktion über 12 Stun-

+ Fräulein S. Kern danke ich für technische Hilfe bei der Durchführung der UV-Messungen.

den im UV-Spektralphotometer verfolgt. Teste mit Ninhydrin, Eisen-3-chlorid, Phloroglucin oder Anilin/Phthalsäure auf Zucker, Ehrlichs Reagenz und mit α-Naphtyl-äthylendiamin-dihydrochlorid nach Bratton-Marshall (116) auf diazotierbare Amine verliefen negativ. Nachweis von aromatischen Hydroxy-säuren mit 2,6-Dibromchinon-4-chlorimid oder Silbernitrat (117) oder Nachweis einer Säurefunktion mit Indikatorfarbstoffen wie Bromphenolblau gelang nicht. Die Substanz reduzierte Triphenyl-tetrazolium-chlorid deutlich auf Papierchromatogrammen (120, 121). Um Störungen der Triphenyltetrazolium-chlorid-Reaktion durch vielleicht noch vorhandene Spuren von Zucker aus der Nährlösung auszuschließen, wurde die Mutante try-8 auch in einem zuckerfreien Medium gezüchtet, bei dem als ausschließ-liche Kohlenstoff-Quelle 4 g Natriumcitrat/Liter zugesetzt wa-ren. Die Reduktion von Triphenyltetrazolium-chlorid war auch in diesen Fällen einwandfrei deutlich zu erkennen.

Um die wichtige Frage zu klären, ob die unbekannte Verbindung Stickstoff enthielt, wurden Mikro-Stickstoff-Bestimmungen durch-geführt. Zur Anwendung kam hierbei die Aufschlußordnung nach Boissonnas und Haselbach (126). Die Bestimmungen wurden nach einer bisher unveröffentlichten Vorschrift (127) durchgeführt und bestanden in einer Umsetzung der Substanz nach Aufschluß mit Nesslers Reagenz in Mikromengen und Messung des gebildeten Farbstoffes im Eppendorf-Photometer. Als Vergleichssubstanz diente Anthranilsäure. Alle durchgeführten Bestimmungen fielen für die unbekannte Substanz positiv aus, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein von Stickstoff in der

isolierten Substanz geschlossen werden kann.

Zur Klärung der Frage, ob die Verbindung in Analogie zum Indolyl-3-glycerin als Phosphorsäureester vorlag, der aber aus Gründen der Permeabilität die Zellmembran der Bakterienzelle nicht oder nur in unbedeutenden Mengen passieren kann, wurde die Mutante try-8 in Gegenwart von $^{32}PO_4$ als Indikator gezüchtet. 250 ml Minimalmedium mit 2,5 mC $^{32}PO_4$ wurden mit 17 L-Tryptophan/ml Nährlösung ergänzt. Nach Beimpfen in der üblichen Weise wurde 12 Stunden bei 37° bebrütet. Die Bakterienzellen wurden dann niedertourig abzentrifugiert, mit physiologischer Kochsalzlösung erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde mit 0,5 ml einer gesättigten Lösung von Natriumfluorid und 2 ml einer gesättigten Lösung von Natrium-äthylendiamintetraacetat als Phosphatase-Hemmstoff versetzt. Schließlich wurden 3 ml einer 20-proz. wässrigen Lösung von Saptenol (Henkel-Werke, Düsseldorf) zugegeben. Nach 12 stündiger Einwirkung des Saptenols wurde bei 20 000 g zentrifugiert, der Überstand gefriergetrocknet, mit Alkohol eluiert und anschließend im Fließmittelsystem n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) und Äthanol-Ammoniak (d = 0,88)-Wasser (80:4:16) aufsteigend chromatographiert. Die Papierchromatogramme wurden in einem automatischen Zählgerät ausgewertet. Alle Papierchromatogramme zeigten übereinstimmend an der Stelle des fluoreszierenden Fleckes eine konzentrierte Radioaktivität.

Um noch weiter zu sichern, daß ein Phosphorsäureester vorlag, wurde ein aliquoter Teil des alkoholischen Eluates mit 1,5 ml

konzentrierter Salzsäure bzw. 1,5 ml 2 n Natronlauge versetzt und das Gemisch ca. 12 Stunden stehengelassen. Dann wurden etwa aktivitätsgleiche Mengen erneut in den oben genannten Systemen aufsteigend chromatographiert. Die Chromatographiestreifen wurden wieder in dem selbstschreibenden Zählgerät ausgewertet. Danach zeigte sich, daß nach Behandeln mit Alkali die Hauptmenge der Radioaktivität nicht mehr mit der Fluoreszenz zusammenfiel, was für einen Phosphorsäureester zu erwarten gewesen war. Durch Stehenlassen mit Säure wurde das mit ^{32}P markierte Produkt nur wenig gespalten.

Eine Mikrohydrierung wurde in der Weise versucht, daß ein Teil des Akkumulates und in einem Parallelversuch zum Vergleich 100 mg Shikimisäure in alkoholischer Lösung in je ein Reaktionsgefäß eines Warburg-Apparates eingebracht wurde. Als Katalysator kamen Spuren von Platindioxyd zur Anwendung. Dann wurde eine Stunde Wasserstoff durchgeleitet, etwa 40 Gasblasen pro Minute. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße verschlossen und bei 30° geschüttelt. Nach 2 Stunden wurden die Reaktionslösungen vom Katalysator abzentrifugiert und im UV-Spektralphotometer gemessen. Eine Veränderung der Spektren konnte dabei nicht beobachtet werden. Auch in wiederholten Versuchen konnten weder die unbekannte Verbindung noch die Shikimisäure als Vergleichssubstanz unter den gewählten Versuchsbedingungen hydriert werden.

In Anlehung an Arbeiten, die zur Isolierung der 5-Dehydrochinasäure und der 5-Dehydroshikimisäure führten (34, 35), wurden

auch Fällungsreaktionen mit Brucin durchgeführt. Eine kleine Menge des Akkumulates wurde in 15 ml Äthanol aufgenommen, filtriert und das Filter mit einigen Tropfen Äthanol gewaschen. Es wurde nun eine Lösung von 1 g Brucin in 10 ml Äthanol zugesetzt. Die alkoholische Lösung wurde zwei Tage in der Kälte stehengelassen. Ein Niederschlag konnte nicht beobachtet werden.

Weitere Fällungsreagentien wurden außerdem angewandt. Eine kleine Menge des Akkumulates wurde wiederum in 10 ml Athanol gelöst und tropfenweise mit einer gesättigten alkoholischen Lösung von Reinecke-Säure ($C_6H_8N_6S_4Cr$) versetzt. Nach mehrtägigem Stehenlassen bei Raumtemperatur als auch in der Kälte konnte keine Fällung beobachtet werden.

Unter den gleichen experimentellen Bedingungen wurde die Isolierung der Substanz mit Pikrinsäure und Hexanitro-diphenylamin versucht, die aber ebenfalls nicht gelang.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden über 300 Mangelmutanten von Escherichia coli durch UV-Bestrahlung und Penicillin-Selektion gewonnen. Unter den Mutanten befanden sich fünf unabhängig voneinander isolierte Tryptophan-Mangelmutanten, die alle Indol akkumulieren. Aus den Kulturmedien auxotropher Mutanten von Salmonella typhimurium, deren genetischer Block innerhalb der Tryptophan-Biosynthese zwischen Anthranilsäure und Indol liegt, wurde ein im UV-Licht blau fluoreszierendes Akkumulat isoliert, das ein der Anthranilsäure ähnliches UV-Absorptionsspektrum zeigt und gleichzeitig charakteristische Reaktionen auf Fructose gibt. Die Prüfung auf Amadori - Verbindungen verlief negativ. Die Verbindung wird deshalb als N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamin angesprochen. Aus den Nährmedien von Tryptophan-Mangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae, die genetisch ebenfalls zu der Gruppe der Tryptophan-Auxotrophen gehören, denen das die Umwandlung der Anthranilsäure in Indolyl-3-glycerin katalysierende Enzymsystem fehlt, wurden zwei im UV-Licht blau fluoreszierende Verbindungen isoliert. Bei der einen dürfte es sich auf Grund ihres Spektrums, ihrer charakteristischen Farbreaktionen auf Anthranilsäure und Fructose und positiver Teste auf Amadori-Verbindungen, um eine 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyfructose handeln. Die andere lieferte positive Reaktionen auf einem C_7-Ketozucker, die Sedoheptulose, und auf Anthranilsäure, gleichzeitig negative Teste auf Produkte der Amadori-Umlagerung. Diese Verbindung ist in Analogie zu dem bei Salmonella gefundenen Zwischenprodukt als N-(o-Car-

boxyphenyl)-sedoheptulosylamin anzusprechen. Zwei verschiedene Wege der Tryptophan-Biosynthese im Bereich zwischen Anthranilsäure und Indol werden diskutiert. Bei Bakterien der Familie Enterobacteriaceae kann die biologische Tryptophan-Synthese über:

Anthranilsäure ⟶ N-(o-Carboxyphenyl)-fructosylamin ⟶ 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose ⟶ Indolyl-3-glycerin

verlaufen, bei Hefen über die Stufen:

N-(o-Carboxyphenyl)-sedoheptulosylamin ⟶ 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyfructose ⟶ Indolyl-erythrit.

Eine Reindarstellung der Akkumulate ist infolge ihrer Labilität und großen Zersetzlichkeit nicht gelungen.

Schließlich wurde aus einer auxotrophen Mutante von Salmonella typhimurium, deren genetischer Block innerhalb der Tryptophan-Biosynthese, zwischen Shikimisäure und Anthranilsäure liegt, ein Akkumulat isoliert, das in der Zelle als Phosphorsäureester vorliegt. Es konnte bisher nur durch sein UV-Absorptionsspektrum, sein papierchromatographisches Verhalten, den Einbau von radioaktivem Phosphat, seine Reduktionswirkung auf Triphenyltetrazolium-chlorid und den positiven Ausfall von Stickstoff-Mikrobestimmungen charakterisiert werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1 G.W.Beadle und E.L.Tatum, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 27,499 (1941).

2 B.O.Dodge, J.Agricult.Res. 35,289 (1927).

3 C.C.Lindegren, Iowa State College J.Sci. 16,271 (1942).

4 C.Yanofsky, J.Biol.Chem. 194,279 (1952).

5 C.Yanofsky, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 38,215 (1952).

6 W.K.Maas, J.Biol.Chem. 198,23 (1952).

7 W.K.Maas und B.D.Davis, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 38,785 (1952)

8 N.H.Horowitz und M.Fling, Genetics 38,360 (1953).

9 N.H.Horowitz und M.Fling, Enzymes: Units of Biological Structure und Function, Academic Press, Inc., New York, 139 (1956).

10 S.R.Suskind, C.Yanofsky und D.M.Bonner, Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 41,577 (1955).

11 C.Yanofsky, Enzymes: Units of Biological Structure and Function, Academic Press, Inc., New York, 147 (1956).

12 J.R.Fincham, Biochem.J. 65,721 (1957).

13 G.W.Beadle und E.L.Tatum, Am.J.Botany 32,678 (1945).

14 G.W.Beadle, Chem.Reviews 37,15 (1945).

15 G.W.Beadle und E.L.Tatum, Physiol.Reviews 25,643 (1945).

16 A.H.Doermann, Arch.Biochem. 5,373 (1944).

17 N.H.Horowitz, D.M.Bonner und M.B.Houlahan, J.Biol.Chem. 159,145 (1945).

18 D.M.Bonner, H.K.Mitchell, E.L.Tatum und G.W.Beadle, Am. Naturalist 79,304 (1945).

19 N.H.Horowitz und U.Leupold, Cold Spring Harbor Symposia Quant.Biol. 16,65 (1951).

20 B.D.Davis, J.Am.Chem.Soc. 70,4267 (1948).

21 B.D.Davis, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 35,1 (1949).

22 J.Lederberg und N.J.Zinder, J.Am.Chem.Soc. 70,4267 (1948).

23 V.W.Woodward, J.R.De Zeeuw und A.M.Srb, Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 40,192 (1954).

24 J.Lederberg, Heredity 2,145 (1948).

25 B.D.Davis, Experientia 6,41 (1950).

26 E.L.Tatum, R.W.Barrat, N.Fries und D.M.Bonner, Am.J. Botany 37,38 (1950).

27 S.Zamenhof und S.Greer, Nature 182,611 (1958).

28 J.Lein, H.K.Mitchell und M.B.Houlahan, Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 34,435 (1948).

29 E.L.Tatum, R.W.Barrat und V.M.Cutler, Science 109,509 (1949).

30 E.L.Tatum, S.R.Gross, G.Ehrensvärd und L.Garnjobst, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 40,271 (1954).

31 B.D.Davis, J.Biol.Chem. 191,315 (1951).

32 H.T.Shigeura und D.B.Sprinson, Federation Proc. 11,286 (1952).

33 F.Lingens und H.Hellmann, Z.Naturforschg. 13b,462 (1958).

34 I.I.Salamon und B.D.Davis, J.Am.Chem.Soc. 75,5567 (1953).

35 U.Weiss, B.D.Davis und E.S.Mingioli, J.Am.Chem.Soc. 75,5572 (1953).

36 M.Gordon, F.A.Haskins und H.K.Mitchell, Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 36,427 (1950).

37 B.D.Davis und E.S.Mingioli, J.Bacteriol. 66,129 (1953).

38 J.G.Carr, A.Pollard, G.C.Whiting und A.H.Williams, Biochem.J. 66,283 (1957).

39 H.Yaniv und C.Gilvarg, J.Biol.Chem. 213,787 (1955).

40 S.Mitsuhashi und B.D.Davis, Biochim.Biophys.Acta 15,54 (1954).

41 U.Weiss und E.S.Mingioli, J.Am.Chem.Soc. 78,2894 (1956).

42 C.Gilvarg, unveröffentlicht.

43 U.Weiss, C.Gilvarg, E.S.Mingioli und B.D.Davis, Science 119,774 (1954).

44 R.L.Metzenberg und H.K.Mitchell, Arch.Biochem.Biophys. 64,51 (1957).

45 S.Simmonds, J.Biol.Chem. 185,755 (1950).

46 B.D.Davis, Science 118,251 (1953).

47 M.Katagiri und R.Sato, Science 118,250 (1953).

48 M.Katagiri, J.Biochem. (Tokyo) 40,629 (1953).

49 D.A.Miller und S.Simmonds, Science 126,445 (1957).

50 J.Baddiley, G.Ehrensvärd, E.Klein, L.Reio und E.Saluste, J.Biol.Chem. 183,777 (1950).

51 C.Cutinelli, G.Ehrensvärd, L.Reio, E.Saluste und R.Stjernholm, Acta Chem.Scand. 5,353 (1951).

52 G.Ehrensvärd und L.Reio, Arkiv Kemi 5,229 (1953).

53 L.Reio und G.Ehrensvärd, Arkiv Kemi 5,301 (1953).

54 G.Ehrensvärd und L.Reio, Arkiv Kemi 5,327 (1953).

55 G.Ehrensvärd, 2nd Int.Congress Biochem., Paris, Symposium on microbial metabolism 72 (1952).

56 C.Gilvarg und K.Bloch, J.Biol.Chem. 193,339 (1951).

57 C.Gilvarg und K.Bloch, J.Biol.Chem. 199,689 (1952).

58 M.Rafelson Jr., G.Ehrensvärd, M.Bashford, E.Saluste und C.-S.Hedén, J.Biol.Chem. 211,725 (1954).

59 R.C.Thomas, V.H.Cheldelin, B.E.Christensen und C.H.Wang, J.Am.Chem.Soc. 75,5554 (1953).

60 R.C.Thomas, V.H.Cheldelin, B.E.Christensen und C.H.Wang, J.Am.Chem.Soc. 77,5448 (1955).

61 J.J.Gosh, Federation Proc. 15,260 (1956).

62 P.R.Srinivasan, H.T.Shigeura, M.Sprecher, D.B.Sprinson und B.D.Davis, J.Biol.Chem. 220,477 (1956).

63 B.D.Davis, Federation Proc. 14,691 (1955).

64 E.B.Kalan, B.D.Davis, P.R.Srinivasan und D.B.Sprinson, J.Biol.Chem. 223,907 (1956)

65 E.B.Kalan und P.R.Srinivasan, Amino Acid Metabolism, The John Hopkins Press, Baltimore, 826 (1955).

66 P.R.Srinivasan, M.Katagiri und D.B.Sprinson, J.Am.Chem. Soc. 77,4943 (1955).

67 P.R.Srinivasan und D.B.Sprinson, Federation Proc. 15,360 (1956).

68 P.R.Srinivasan, D.B.Sprinson, E.B.Kalan und B.D.Davis, J.Biol.Chem. 223,913 (1956).

69 P.Fildes, Brit.J.Exp.Pathol. 22,293 (1941).

70 E.E.Snell, Arch.Biochem. 2,383 (1943).

71 E.L.Tatum, D.M.Bonner und G.W.Beadle, Arch.Biochem. 3,477 (1944).

72 E.L.Tatum und D.M.Bonner, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 30,30 (1944).

73 W.W.Umbreit, W.A.Wood und I.C.Gunsalus, J.Biol.Chem. 165,731 (1946).

74 J.F.Nyc, H.K.Mitchell, E.Liefer und W.H.Langham, J.Biol. Chem. 179,783 (1949).

75 C.W.H.Patridge, D.M.Bonner und C.Yanofsky, J.Biol.Chem. 194,269 (1954).

76 N.Fries, Physiol.Plantarum, 3,185 (1950).

77 C.Yanofsky, J.Biol.Chem. 217,345 (1955).

78 C.Yanofsky, Science 121,138 (1955).

79 E.M.Rafelson Jr., J.Biol.Chem. 213,479 (1955).

80 J.S.Gots, W.Y.Koh und G.R.Hunt Jr., J.Gen.Microbiol. 11,7 (1954).

81 S.Brenner, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 41,862 (1955).

82 P.A.Trudinger, Biochem.J. 62,480 (1956).

83 F.W.E.Gibson, Nature 175,853 (1955).

84 C.Yanofsky, J.Biol.Chem. 223,171 (1956).

85 C.Yanofsky, Biochim.Biophys.Acta 20,438 (1956).

86 C.Yanofsky, J.Biol.Chem. 224,783 (1957).

87 F.Lingens, H.J.Burkhardt, H.Hellmann und F.Kaudewitz, Z.Naturforschg. 12b,493 (1957).

88 F.Lingens und H.Hellmann, Angew.Chemie 69,97 (1957).

89 J.S.Gots und S.H.Ross, Biochim. Biophys.Acta 24,429 (1957).

90 H.T.Teas, unveröffentlicht.

91 B.N.Ames und H.K.Mitchell, J.Biol.Chem. 212,687 (1955).

92 B.N.Ames, Federation Proc. 16,145 (1957).

93 J.Westley und J.Ceithaml, Arch.Biochem.Biophys. 60,215 (1956).

94 L.E.Rhuland und R.C.Bard, J.Bacteriol. 63,133 (1952).

95 F.Lingens, H.J.Burkhardt und H.Hellmann, Z.Naturforschg. 13b,644 (1958).

96 C.Yanofsky und M.Rachmeler, Biochim. Biophys.Acta 28,640 (1958).

97 H.K.Mitchell und J.Lein, J.Biol.Chem. 175,481 (1948).

98 E.L.Tatum und D.Shemin, J.Biol.Chem. 209,671 (1954).

99 D.E.Metzler, M.I.Ikawa und E.E.Snell, J.Am.Chem.Soc. 76,648 (1954).

100 E.A.Adelberg und J.W.Myers, J.Bacteriol. 65,348 (1953).

101 F.Lingens, R.Nagel und H.Hellmann, unveröffentlicht.

102 R.K.Mortimer, R.S.Lerner und J.K.Barr, U.S.Atomic Energy Commission UCRL - 3746 (1957).

103 F.Kaudewitz, Z.Naturforschg. 10b,562 (1955).

104 A.A.Eddy, J.Gen.Microbiol. 13,XIII (1955).

105 A.A.Eddy und B.Kirsop, J.Inst.Brewing 61,382 (1955).

106 L.W.Parks und H.C.Douglas, Biochim. Biophys.Acta 23,207 (1957).

107 F.Lingens, H.Hellmann und M.Hildinger, Z.Naturforschg. 13b,727 (1958).

108 W.Pigman, The Carbohydrates, Academic Press Inc., New York, 422 (1957).

109 J.E.Hodge, Adv.Carbohydrate Chemistry 10,169 (1955).

110 F.W.E.Gibson, C.H.Doy und S.B.Segall, Nature 181,549 (1958).

111 F.Lingens, M.Hildinger und H.Hellmann, Biochim. Biophys. Acta 30,668 (1958).

112 F.Lingens und M.Hildinger, 4th Int.Congress Biochem. Wien, Abstr. of Commun. 188 (1958).

113 C.H.Doy und F.Gibson, Biochem.J. (im Druck).

114 K.Voigt, J.Prakt.Chem. (2) 34,2 (1886).

115 F.Lingens, H.J.Burkhardt, H.Hellmann und F.Kaudewitz, Z.Naturforschg. 13b,497 (1957).

116 A.C.Bratton und E.K.Marshall, J.Biol.Chem. 188,783 (1951).

117 H.G.Bray, W.V.Thorpe und K.White, Biochem.J. 46,271 1950).

118 E.Borenfreund und Z.Dische, Arch.Biochem.Biophys. 67,239 (1957).

119 Z.Dische und E.Borenfreund, J.Biol.Chem. 192,583 (1951).

120 K.Wallenfels, Naturwissenschaften 37,491 (1950).

121 K.Wallenfels, Arztl.Forschg. 5,430 (1951).

122 R.Johanson, Nature 172,956 (1953).

123 W.E.Trevelyan, D.P.Procter und J.S.Harrison, Nature 166,444 (1950).

124 G.Weitzel, H.-U.Geyer und A.-M.Fretzdorf, Ber.deutsch. chem.Ges. 90,1153 (1957).

125 A.Bevenue und K.T. Williams, Arch.Biochem.Biophys. 34,225 (1951).

126 R.A.Boissonnas und C.H.Haselbach, Helv.Chim.Acta 36,577 (1953).

127 R.Henzi, Theodor-Kocher-Institut, Universität Bern, persönliche Mitteilung.

L E B E N S L A U F

Am 11. Mai 1925 wurde ich in Karlsruhe geboren. Meine Eltern sind Reinhold G. Hildinger und dessen Ehefrau Carolina geb. Ekbom. Ich besuchte die Volksschule in Djursholm und die Realschule in Stockholm. 1936/43 war ich Schüler des Bismarck-Gymnasium in Karlsruhe. 1944 erhielt ich von dieser Schule das Reifezeugnis. In den Jahren 1943/45 leistete ich Militärdienst. Nach der praktischen Ausbildung in einer Apotheke 1946/47, bestand ich am 30.9.1947 die pharmazeutische Vorprüfung. Zum Studium der Naturwissenschaften immatrikulierte ich mich 1947 an der Stockholms Högskola. An der Universität Freiburg und der Technischen Hochschule Karlsruhe studierte ich 1948/50 Pharmazie. 1951 setzte ich mein Studium in den Fächern Mikrobiologie und Biochemie an der Stockholms Högskola fort. Im Jahre 1952 erwarb ich den Grad eines Kandidaten der Philosophie (naturwiss. Sektion). 1951/52 arbeitete ich als Forschungsassistent in einer Arbeitsgruppe des Schwedischen Forschungsrates am Institut für Lebensmittelchemie der Kungliga Tekniska Högskolan in Stockholm. Am Pharmakologischen Institut des Karolinska Institutet war ich 1953/56 als Assistent angestellt. Meine Ausbildung in spezieller chemischer Mikrobiologie erhielt ich 1955/56 am "Wenner-Grens-Institut för experimentell biologie" unter Leitung von Professor G. Ehrensvärd.

In der Zeit 1956/58 war ich Stipendiat des Svenska Institutet. Ich studierte zunächst Bateriengenetik am Institut für Mikrobiologie der Universität Frankfurt/Main und arbeitete bis 1958 am chemischen Institut der Universität Tübingen als Doktorand unter der Leitung von Professor Dr.H. Hellmann.